

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 809**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/32** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2011 PCT/JP2011/061709**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2011 WO11145744**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2011 E 11783675 (9)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2573120**

54 Título: **Anticuerpo anti-TROP-2 humano que tiene actividad antitumoral in vivo**

30 Prioridad:

**17.05.2010 JP 2010113302**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.04.2018**

73 Titular/es:

**CHIOME BIOSCIENCE INC. (100.0%)  
 3-12-1 Honmachi, Shibuya-ku  
 Tokyo, JP**

72 Inventor/es:

**NAKAMURA, KOJI;  
 OKAMURA, KENTARO;  
 TAMURA, MAKI;  
 YANAI, HIROYUKI y  
 KANKE, TORU**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 664 809 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-TROP-2 humano que tiene actividad antitumoral *in vivo*

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-TROP-2 humano que tiene actividad antitumoral, y en particular, a un anticuerpo anti-TROP-2 humano que tiene actividad antitumoral *in vivo*. Además, la presente invención se refiere a un hibridoma, que produce el anticuerpo mencionado anteriormente, y un uso del anticuerpo mencionado anteriormente.

**Antecedentes de la técnica**

El TROP-2 humano (Tacstd2, GA733-1 y EGP-1) (también denominado "hTROP-2" en lo sucesivo en el presente documento) es una proteína de la membrana celular de tipo 1, transmembrana individual que consiste en 323 restos de aminoácidos (véase SEQ ID NO: 2), y se ha sabido que esta proteína estaba sobreexpresada en diversos tipos de carcinomas de células epidérmicas. Desde hace mucho tiempo se ha sugerido la presencia de una proteína de membrana celular asociada con resistencia inmunológica, que comúnmente se expresa tanto en trofoblastos como en células cancerosas humanas (Documento de No Patente 1). Se identificó una molécula de antígeno reconocida por anticuerpos monoclonales de ratón (162-25.3, 162-46.2) que reacciona con la proteína de membrana celular de una línea BeWo de células de coriocarcinoma humano. Esta molécula de antígeno fue considerada como una de las moléculas expresadas en trofoblastos humanos, y se denominó Trop-2 (Documento de No Patente 2). A partir de ese momento, la misma molécula fue descubierta por otros investigadores. Es decir, un antígeno tumoral reconocido por un anticuerpo monoclonal GA733 de ratón que se obtiene mediante inmunización con células SW948 de cáncer de estómago se denominó GA733-1 (Documento de No Patente 3), y una glicoproteína epitelial reconocida por un anticuerpo monoclonal RS7-3G11 de ratón que se obtiene mediante inmunización con células de cáncer de pulmón de células no microcíticas se denominó antígeno epitelial/carcinoma, EGP-1 (Documento de No Patente 4). En 1995, el gen Trop-2 se clonó, y como resultado, se confirmó que estas son las mismas moléculas (Documento de No Patente 5). Además, se aclaró que la molécula tiene una función para amplificar señales de calcio intracelular en células cancerosas (Documento de No Patente 6), y por lo tanto, también se denomina transductor 2 de señales de calcio asociado a tumor (TACSTD2).

En el cromosoma 1p32h se hacen mapas del gen TROP-2, y éste constituye una familia genética de TACSTD junto con GA733-2 que tiene una homología de aproximadamente un 50 % con ello (que se ha conocido como "TACSTD1", "glicoproteína epitelial EGP-2", "EpCAM" o "Trop-1") (Documento de No Patente 7). La proteína hTROP-2 (323 restos de aminoácidos; SEQ ID NO: 2) tiene un peso molecular de aproximadamente 36 KDalton, y esta proteína consiste en un péptido señal hidrófilo (1<sup>er</sup> a 26<sup>o</sup> aminoácidos), un dominio extracelular (27<sup>o</sup> a 274<sup>o</sup> aminoácidos), un dominio transmembrana (275<sup>o</sup> a 297<sup>o</sup> aminoácidos) y un dominio intracelular (298<sup>o</sup> a 323<sup>o</sup> aminoácidos). El dominio extracelular tiene cuatro sitios de glicosilación unidos a N heterogéneos, y es evidente que su peso molecular aumenta de 11 a 13 KDalton debido a la adición de cadenas de azúcar (Documento de No Patente 5). Se considera que la familia genética TACSTD quien la secuencia de repetición de tiroglobulina (TY) característica en el dominio extracelular y está asociada con la proliferación, invasión y metástasis de células cancerosas.

Hasta la fecha, no se ha identificado un ligando fisiológico de hTROP-2, y la función molecular del mismo no se ha aclarado. Sin embargo, se ha descrito que hTROP-2 transmitió una señal de calcio en células tumorales (Documento de No Patente 6). Además, a partir de los hechos de que la serina intracelular 303 está fosforilada por la proteína quinasa C dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Documento de No Patente 4) y que hTROP-2 tiene una secuencia de unión a PIP2 en su dominio intracelular, se ha sugerido que hTROP-2 tiene una función de señalización en células tumorales (Documento de No Patente 8).

Como resultado de estudios de diagnóstico *in vitro* tales como inmunohistoquímica (IHC) y análisis de citometría de flujo, se ha informado de la sobreexpresión de hTROP-2 en muchos tipos de carcinomas obtenidos a partir de epitelio tales como cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de hígado y cáncer de esófago. Por el contrario, la expresión de hTROP-2 en tejidos normales está limitada a células en la región epitelial, y el nivel de expresión de hTROP-2 en células normales es inferior al que hay en células cancerosas. Por lo tanto, se sugiere la asociación de TROP-2 con la formación de tumores (Documentos de Patente 1-3 y 9).

Además, en el análisis de un nivel de expresión de hTROP-2 usado como un biomarcador en muestras clínicas, se ha demostrado que, cuando hTROP-2 está altamente expresado, se correlaciona con la malignidad de un cáncer de colon (Documentos de No Patente 10 y 11), cáncer pancreático (Documento de No Patente 12) o cáncer oral (Documento de No Patente 13), la posibilidad de metástasis o recurrencia de un cáncer de este tipo es significativamente elevada. Además, en un análisis de expresión genética a gran escala usando una técnica de micromatriz de ADNc, hTROP-2 se ha identificado como un grupo genético, que está sobre expresado al nivel más elevado en carcinoma papilar severo del ovario, en comparación con el epitelio de ovario normal (Documento de No

Patente 14).

Además adicionalmente, en los últimos años, se ha demostrado un papel importante de hTROP-2 en la formación de tumores en los modelos usando células de cáncer de colon (Documento de No Patente 15). Dado que la expresión of hTROP-2 estimula la proliferación celular independiente del anclaje y que se requiere para la formación de tumor y proliferación de células cancerosas trasplantadas por vía subcutánea en ratones inmunodeficientes, aumenta la posibilidad de que hTROP-2 podría actuar como un antígeno tumoral funcional y que se podría usar como una nueva diana terapéutica.

Hasta la fecha, se ha informado de estudios con respecto a los efectos antitumorales de varios anticuerpos anti-hTROP-2. Se ha examinado un anticuerpo RS7 (Documento de Patente 1) usando modelos *in vivo*, en los que se usaron anticuerpos radioetiquetados, y se demostró una actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de ratón atímico. Sin embargo, no se ha informado de los efectos antitumorales solamente con anticuerpo (un anticuerpo desnudo).

Además, se ha informado de la citotoxicidad de un anticuerpo monoclonal BR110 anti-hTROP-2 unido a citotoxina (Documento de Patente 2) en las líneas de células H3619, H2987, MCF-7, H3396 y H2981 de cáncer humano en experimentos *in vitro*. Sin embargo, todavía no se ha desvelado la citotoxicidad de un anticuerpo desnudo o un conjugado inmunológico de Bur110 *in vivo*.

En los últimos años, se ha informado de que un anticuerpo monoclonal aislado, que se produjo a partir de una línea de células de hibridoma AR47A6.4.2 o AR52A301.5 obtenida inmunizando ratones con tejidos de cáncer de ovario humano, unidos a hTROP-2, y que, por primera vez, presentaba, como un anticuerpo desnudo, actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de ratón atímico, así como citotoxicidad *in vitro* (Documentos de Patente 3 y 4). En estos documentos de patente, el anticuerpo mencionado anteriormente presentaba efectos anti tumorales por tratamiento solamente con anticuerpo en modelos de xenoinjerto de ratón, en los que se habían trasplantado líneas de células de cáncer pancreático, BxPC-3 y PL45, una línea de células de cáncer de próstata, PC-3, una línea de células de cáncer de mama, MCF-7 y una línea de células de cáncer de colon, Colo205. Los efectos terapéuticos del anticuerpo han aparecido los modelos, en los que se habían trasplantado células BxPC-3. Además de esto, la formación y proliferación tumoral solo se suprimían parcialmente (aproximadamente de un 40 % a un 60 %) mediante la administración preventiva del anticuerpo, y era necesaria una cantidad extremadamente grande (aproximadamente 20 mg/kg) del anticuerpo para una supresión de una formación y proliferación tumoral de este tipo.

Basándose en los hallazgos previos mencionados anteriormente, se ha sugerido el uso potencial del anticuerpo anti-hTROP-2 como un anticuerpo antitumoral. Sin embargo, no todos los anticuerpos anti-hTROP-2 presentan efectos antitumorales por tratamiento con anticuerpo solo como anticuerpos desnudos *in vivo*. Los anticuerpos presentan diferentes funciones para hTROP-2, dependiendo de un sitio de unión, afinidad y el perfil de un anticuerpo monoclonal.

Documento de Patente 1: documento de Patente de Estados Unidos N.º 665.3104  
 Documento de Patente 2: documento de Patente de Estados Unidos N.º 5840854  
 Documento de Patente 3: documento de Patente de Estados Unidos N.º 7420040  
 Documento de Patente 4: documento de Patente de Estados Unidos N.º 7420041  
 Documento de No Patente 1: Faulk WP, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75 (4), pp. 1947-1951 (1978)  
 Documento de No Patente 2: Lipinski M, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78 (8), pp. 5147-5150 (1981)  
 Documento de No Patente 3: Linnenbach AJ, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86 (1), pp. 27-31 (1989)  
 Documento de No Patente 4: Basu A, *et al.*, Int. J. Cancer, 62 (4), pp. 472-479 (1995)  
 Documento de No Patente 5: Fornaro M, *et al.*, Int. J. Cancer, 62 (5), pp. 610-618 (1995)  
 Documento de No Patente 6: Ripani E, *et al.*, Int. J. Cancer, 76 (5), pp. 671-676 (1998)  
 Documento de No Patente 7: Calabrese G, *et al.*, Cell Genet., 92 (1-2), pp. 164-165 (2001)  
 Documento de No Patente 8: El Sewedy T *et al.*, Int. J. Cancer, 75 (2), pp. 324-330 (1998)  
 Documento de No Patente 9: Cubas R, *et al.*, Biochim. Biophys. Acta., 1796 (2), pp. 309-314 (2009)  
 Documento de No Patente 10: Ohmachi T *et al.*, Clin. Cancer Res., 12 (10), pp. 3057-3063 (2006)  
 Documento de No Patente 11: Fang YJ, *et al.*, Int. J. Colorectal Dis., 24 (8), pp. 875-884 (2009)  
 Documento de No Patente 12: Fong D, *et al.*, Br. J. Cancer, 99 (8), pp. 1290-1295 (2008)  
 Documento de No Patente 13: Fong D, *et al.*, Mod. Pathol., 21 (2), pp. 186-191 (2008)  
 Documento de No Patente 14: Santin AD, *et al.*, Int. J. Cancer, 112 (1), pp. 14-25 (2004)  
 Documento de No Patente 15: Wang J, *et al.*, Mol. Cancer Ther., 7 (2), pp. 280-285 (2008)

## Resumen de la Invención

En las circunstancias mencionadas anteriormente, se ha deseado desarrollar un anticuerpo anti-hTROP-2 (un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2) que tenga actividad antitumoral *in vivo* elevada, y en particular, un anticuerpo anti-hTROP-2 o similares, que tenga un efecto antitumoral como un anticuerpo desnudo solo *in vivo* y además, que tenga el efecto antitumoral a una dosis baja.

La presente invención se ha completado, a la vez que se tenían en cuenta las circunstancias mencionadas anteriormente. La presente invención proporciona un anticuerpo anti-hTROP-2 (un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2), un hibridoma, que produce el anticuerpo, un fragmento del anticuerpo, un complejo (un inmunocombinado) del anticuerpo y un fármaco, una composición farmacéutica para diagnosticar o tratar un tumor, un método para detectar un tumor, un kit para detectar o diagnosticar un tumor que se describirán a continuación.

(1) Un anticuerpo contra TROP-2 humano, que tiene actividad antitumoral *in vivo* y en el que:

(a) la región V de la cadena H del anticuerpo consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 35 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 20 a 134 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 35, y la región V de la cadena L de la misma consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 40 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 21 a 127 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 40; o

(b) la región V de la cadena H del anticuerpo consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 65 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 20 a 141 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 65, y la región V de la cadena L de la misma consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 70 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 20 a 130 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 70.

Los ejemplos del anticuerpo de acuerdo con (1) mencionado anteriormente incluyen un anticuerpo que tiene actividad antitumoral en dos o más tipos de líneas de células tumorales humanas. En el presente documento, el tumor es, por ejemplo, al menos un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano, y en particular, cáncer pancreático humano. Además, el tumor también incluye un cáncer recurrente y un cáncer metastásico. Además, las líneas de células tumorales son de al menos dos tipos seleccionados entre el grupo que consiste en una línea de células de cáncer pancreático humano PK-59, una línea de células BxPC-3 de cáncer pancreático humano, una línea de células de cáncer pancreático humano KP-3L, una línea de células de cáncer pancreático humano KP-2, una línea de células de cáncer pancreático humano PK-1, una línea de células de cáncer pancreático humano PK-45H, una línea de células de cáncer pancreático humano PK-45P, una línea de células de cáncer pancreático humano TCC-PAN2, una línea de células de cáncer pancreático humano SUIT-2, una línea de células de cáncer de colon humano CACO-2, una línea de células de cáncer de colon humano SW480, una línea de células de cáncer de colon humano DLD-1, una línea de células de cáncer de colon humano HCT 116, una línea de células de cáncer de mama humano JIMT-1, una línea de células de cáncer de mama humano HCC1143, una línea de células de cáncer de mama humano MCF-7, una línea de células de cáncer de próstata humano DU145 y una línea de células de cáncer de próstata humano PC-3; y en particular, una línea de células de cáncer pancreático humano PK-59 y una línea de células BxPC-3 de cáncer pancreático humano.

Un ejemplo del anticuerpo de acuerdo con (1) mencionado anteriormente es un anticuerpo monoclonal.

Un ejemplo del anticuerpo de acuerdo con (1) mencionado anteriormente es un anticuerpo genéticamente recombinante, y los ejemplos más específicos incluyen un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano.

(2) Un anticuerpo monoclonal contra TROP-2 humano, que se produce por un hibridoma que tiene el N.º de registro FERM BP-11251 o FERM BP-11346.

Los ejemplos del anticuerpo de acuerdo con (1) y (2) mencionados anteriormente incluyen: un anticuerpo, que se une a un sitio, al que un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma que tiene el N.º de registro FERM BP-11251 o FERM BP-11346; y un anticuerpo, que se une a una porción que comprende al menos una región (por ejemplo, una región cualquiera) seleccionada entre el grupo que consiste en una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 43 a 65, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 152 a 165, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 171 a 183, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 109 a 120, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 43 a 56, y una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 193 a 206, en la secuencia de aminoácidos de TROP-2 humano mostrada en la SEQ ID NO: 2.

(3) Un fragmento de anticuerpo obtenido a partir del anticuerpo de acuerdo con (1) o (2) mencionados anteriormente, que comprende:

(a) la región V de la cadena H del anticuerpo quimérico consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 35 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 20 a 134 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 35, y la región V de la cadena L de la misma consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 40 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 21 a 127 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 40; o

(b) la región V de la cadena H del anticuerpo quimérico consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 65 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 20 a 141 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 65, y la región V de la cadena L de la misma consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 70 o la secuencia de

aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 20 a 130 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 70.

(4) Un hibridoma, que produce el anticuerpo de acuerdo con (1) o (2) mencionados anteriormente.

(5) Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal contra TROP-2 humano, que tiene el N.º de registro FERM BP-11251 o FERM BP-11346.

(6) Un conjugado de anticuerpo-fármaco, que comprende el anticuerpo de acuerdo con (1) o (2) mencionados anteriormente y una sustancia que tiene actividad antitumoral y/o actividad de eliminación de células.

(7) Un conjugado de anticuerpo-fármaco, que comprende el fragmento de anticuerpo de acuerdo con (3) mencionado anteriormente y una sustancia que tiene actividad antitumoral y/o actividad de eliminación de células.

Con respecto al conjugado de acuerdo con (6) y (7) mencionados anteriormente, el tumor es, por ejemplo, al menos un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano, y en particular, cáncer pancreático humano. Además, el tumor también incluye un cáncer recurrente y un cáncer metastásico.

(8) Una composición farmacéutica, que comprende al menos un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en el anticuerpo de acuerdo con (1) y (2) mencionados anteriormente, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con (3) mencionado anteriormente y el conjugado de acuerdo con (6) y (7) mencionados anteriormente.

Un ejemplo de la composición de acuerdo con (8) mencionado anteriormente es una composición usada en el tratamiento de tumores, y en particular, una composición, que no produce una reducción del peso como un efecto secundario. Otro ejemplo de la composición es una composición usada en el diagnóstico de tumores. En el presente documento, el tumor es, por ejemplo, al menos un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano, Y en particular, cáncer pancreático humano. Además, el tumor también incluye un cáncer recurrente y un cáncer metastásico.

(9) Una composición farmacéutica, que comprende al menos un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en el anticuerpo de acuerdo con (1) y (2) mencionados anteriormente, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con (3) mencionado anteriormente y el conjugado de acuerdo con (6) y (7) mencionados anteriormente para uso en un método para tratar un tumor.

Un ejemplo del método para tratar un tumor es un método que no produce una reducción del peso como un efecto secundario. Con respecto a la composición farmacéutica de acuerdo con (9) mencionada anteriormente, el tumor es, por ejemplo, al menos un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano, and particularmente, cáncer pancreático humano. Además, el tumor también incluye un cáncer recurrente y un cáncer metastásico.

(10) Un método para detectar un tumor, que comprende: permitir que al menos un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en el anticuerpo de acuerdo con (1) y (2) mencionados anteriormente, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con (3) mencionado anteriormente el conjugado de acuerdo con (6) y (7) mencionados anteriormente, reaccionen con una muestra recogida de un organismo vivo; y a continuación detectar una señal(es) del anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo que se ha hecho reaccionar.

Con respecto al método de acuerdo con (10) mencionado anteriormente, el tumor es, por ejemplo, al menos un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano, y en particular, cáncer pancreático humano. Además, el tumor también incluye un cáncer recurrente y un cáncer metastásico.

(11) Un kit para tratar, diagnosticar o detectar un tumor, que comprende al menos un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en el anticuerpo de acuerdo con (1) y (2) mencionados anteriormente, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con (3) mencionado anteriormente el conjugado de acuerdo con (6) y (7) mencionados anteriormente.

Con respecto al kit de acuerdo con (11) mencionado anteriormente, el tumor es, por ejemplo, al menos un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano, y en particular, cáncer pancreático humano. Además, el tumor también incluye un cáncer recurrente y un cáncer metastásico.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la medición de la afinidad de unión a antígeno (Kd: constante de disociación) de un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (K5-70). Ant: Anticuerpo (total); Antíg: Antígeno (libre).

La Figura 2 muestra la reactividad de un sobrenadante de cultivo de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2, con células HuH-7 (TROP-2-negativo) y células HuH-7-hTROP-2. El histograma relleno indica células HuH-7, y el histograma no relleno indica células HuH-7-hTROP-2.

La Figura 3 muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 con una línea de células de cáncer pancreático humano (células PK-59), que expresa hTROP-2 de manera endógena en la superficie celular. El histograma relleno indica la reacción de la línea celular solamente con un anticuerpo secundario (IgG anti-ratón etiquetado con PE), y el histograma no relleno indica la reacción de la línea celular con cada anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2.

La Figura 4 muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 con una línea de células de cáncer pancreático humano (células BxPC-3), que expresa hTROP-2 de manera endógena en la superficie

celular. El histograma relleno indica la reacción de la línea celular solamente con un anticuerpo secundario (IgG anti-ratón etiquetado con PE), y el histograma no relleno indica la reacción de la línea celular con cada anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2.

La Figura 5 muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (K5-70) con línea de células de cáncer pancreáticos. El histograma relleno indica la reacción de la línea celular solamente con un anticuerpo secundario (IgG anti-ratón etiquetado con PE), y el histograma no relleno indica la reacción de la línea celular con cada anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2.

La Figura 6 muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (K5-70) con líneas de células de cáncer de colon humano (Colo320, CACO2, SW480, DLD1, CW2 y HCT 116), líneas de células de cáncer de mama humano (JIMT-1 y HCC1143), y líneas de células de cáncer de próstata humano (PC-3 y DU145). El histograma relleno indica la reacción de la línea celular solamente con un anticuerpo secundario (IgG anti-ratón etiquetado con PE), y el histograma no relleno indica la reacción de la línea celular con el anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2.

La Figura 7 muestra la reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 con TROP-2 de ratón. Se usaron células preparadas permitiendo que un gen TROP-2 de ratón se expresara de forma transitoria en células CHO-K1, y se usó un anticuerpo T2-102 (IgG1 de ratón) que presentaba reactividad cruzada con TROP-2 de ratón como un anticuerpo de control positivo. El histograma relleno indica la reacción de las células solo con un anticuerpo secundario (IgG anti-ratón etiquetado con PE), y el histograma no relleno indica la reacción de las células con cada anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2.

La Figura 8 muestra la reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 con EpCAM/TROP-1 humano. Se usaron células preparadas permitiendo que un gen EpCAM/TROP-1 humano se expresara de forma transitoria en células CHO-K1, y se usó un anticuerpo monoclonal anti-EpCAM humano etiquetado con PE (Becton, Dickinson and Company) como un anticuerpo de control positivo. El histograma relleno indica la reacción de las células solo con un anticuerpo secundario (IgG anti-ratón etiquetado con PE), y el histograma no relleno indica la reacción de las células con cada anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2.

La Figura 9 muestra la actividad inhibitoria del crecimiento celular de anticuerpos anti-hTROP-2 (T6-16, T5-86, K5-70 y K5-107) en una línea de células de cáncer pancreático humano (células PK-59). mlgG indica un anticuerpo de control (IgG de ratón), e YY01 indica un anticuerpo anti-hTROP-2 disponible en el mercado (Santa Cruz). Columna de color blanco: 0 µg/ml; columna de color gris: 0,1 µg/ml; columna de color negro: 1 µg/ml. El nivel de actividad se expresó como una proporción con respecto al valor en el caso de no añadir anticuerpo (0 µg/ml). La barra de error indica una desviación estándar. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 (mediante ensayo t de Student).

La Figura 10 muestra un ensayo de raspado de una línea de células de cáncer pancreático humano (células PK-59) en presencia de anticuerpos anti-hTROP-2 (T6-16 y K5-70).

La Figura 10A muestra ejemplos representativos de fotografías de las regiones de raspado de células PK-59. El Día 0 muestra un ejemplo representativo inmediatamente después del raspado. mlgG (Día 1) muestra una fotografía tomada 1 día (24 horas) después del raspado y a continuación añadiendo un anticuerpo de control (IgG de ratón, 1 µg/ml) al medio. K5-70 (Día 1) muestra una fotografía tomada 1 día (24 horas) después del raspado y a continuación añadiendo un anticuerpo K5-70 (1 µg/ml) al medio. T6-16 (Día 1) muestra una fotografía tomada 1 día (24 horas) después del raspado y a continuación añadiendo un anticuerpo T6-16 (1 µg/ml) al medio. Cada flecha en cada fotografía indica el ancho de una región de raspado.

Figura 10B. El área de una región de raspado se analizó usando software de análisis de imágenes (Scion Image), y basándose en el valor obtenido, los valores de diversos tipos de otras muestras se calcularon usando el Día 0 del grupo de adición de mlgG de control como un valor patrón de 1. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 (mediante ensayo t de Student).

La Figura 11 muestra análisis de FACS usando un marcador de células madre, que se ha realizado en una línea de células de cáncer pancreático humano PK-59. La Figura 11A es una vista que ilustra FACS que muestra la expresión de EpCAM en las células PK-59. El histograma relleno indica la reacción de las células solo con un anticuerpo secundario (IgG anti-ratón etiquetado con PE), y el histograma no relleno indica la reacción de las células con un anticuerpo anti-EpCAM humano (Becton, Dickinson and Company). La Figuras 11B y C son vistas que ilustran FACS que muestra la expresión de P-glicoproteína/MCR1 de las células PK-59 (Figura 11B), o la expresión de ABCG2 en las células PK-59 (Figura 11C). El histograma de color azul indica la reacción de las células solo con un anticuerpo secundario, y el histograma de color rojo indica la reacción de las células con un anticuerpo anti-P-glicoproteína/MDR1 humano (BD Biosciences Pharmingen) (Figura 11B), o con un anticuerpo anti-ABCG2 humano (BD Biosciences Pharmingen) (Figura 11C). La Figura 11D muestra análisis de FACS, en el que las células PK-59 se sometieron a doble tinción con marcadores de células madre de cáncer pancreático, un anticuerpo anti-CD24 humano etiquetado con FITC (BD Biosciences Pharmingen) y un anticuerpo anti-CD44 humano etiquetado con PE (BD Biosciences Pharmingen). Cada número en la Figura 11D indica la proporción existente de las células en cada fracción.

La Figura 12 muestra la evaluación de la actividad antitumoral de un nuevo clon K5-70 de anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (IgG2a de ratón) en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando células PK-59.

La Figura 12A muestra el transcurso del tiempo del crecimiento tumoral de un grupo de control (IgG de ratón) y un grupo de administración de K5-70 (un valor medio ± desviación estándar). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpo. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 (mediante ensayo t de Student).

La Figura 12B muestra el peso del tumor representado de cada ratón en el momento del 21<sup>er</sup> día (Día 21) (el día final del experimento) en el ensayo de la Figura 12A. El valor numérico en cada representación indica un valor medio ± desviación estándar. \*\* P < 0,01 (mediante ensayo t de Student).

La Figura 13 muestra la evaluación de la actividad antitumoral de un clon K5-107 (A), un clon T6-16 (B) y un clon K5-116-2-1 (C) en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando células PK-59. El símbolo "●" indica un grupo de control (IgG de ratón), y el símbolo "○" indica un grupo de administración de anticuerpo anti-hTROP-2. La flecha en el gráfico indica un periodo de administración de anticuerpo, y el valor numérico en cada representación indica un valor medio  $\pm$  desviación estándar. \*  $P < 0,05$  (mediante ensayo t de Student).

La Figura 14 muestra la evaluación de la actividad antitumoral de un clon K5-70 (A), un clon T6-16 (B) y un clon K5-116-2-1 (C) en modelos de prevención de xenoinjerto usando células PK-59. El símbolo "●" indica un grupo de control (IgG de ratón), y el símbolo "○" indica un grupo de administración de anticuerpo anti-hTROP-2. La flecha en el gráfico indica un periodo de administración de anticuerpo, y el valor numérico en cada representación indica un valor medio  $\pm$  desviación estándar. \*\*  $P < 0,01$  (mediante ensayo t de Student).

La Figura 15 muestra la evaluación de la actividad antitumoral de un clon K5-70 en modelos de prevención y tratamiento de xenoinjerto usando células BxPC-3. La Figura 15A muestra el transcurso del tiempo del crecimiento tumoral de un grupo de control (IgG de ratón) y un grupo de administración de K5-70 en modelos de prevención (un valor medio  $\pm$  desviación estándar). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpo. \*\*  $P < 0,01$  (mediante ensayo t de Student). La Figura 15B muestra el transcurso del crecimiento tumoral de un grupo de control (IgG de ratón) y un grupo de administración de K5-70 en modelos de tratamiento (un valor medio  $\pm$  desviación estándar). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpo. \*  $P < 0,05$  (mediante ensayo t de Student).

La Figura 16 muestra la actividad antitumoral dependiente de la dosis de un clon K5-70 en modelos de prevención de xenoinjerto usando células PK-59. El volumen de un tumor se expresa como un valor medio  $\pm$  desviación estándar.

La Figura 16A muestra el transcurso del tiempo del crecimiento tumoral de un grupo de control y grupos de administración de K5-70 a diferentes dosis (un valor medio  $\pm$  desviación estándar). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpo. \*  $P < 0,05$  (mediante ensayo t de Student), \*\*  $P < 0,01$  (mediante ensayo t de Student).

La Figura 16B muestra el peso del tumor representado de cada ratón en el momento del 17º día (Día 17) (el día final del experimento) en el ensayo de la Figura 16A. El valor numérico en cada representación indica un valor medio  $\pm$  desviación estándar. \*\*  $P < 0,01$  (mediante ensayo t de Student).

La Figura 17 es una vista esquemática de una proteína TROP-2 quimérica de ser humano/ratón usada en el experimento. SP: secuencia señal; dominio TY: región de tipo 1 de tiroglobulina; TM: región transmembrana; C: región intracelular, en la que la región rellena es un polipéptido obtenido a partir de hTROP-2, mientras que la región no rellena es un polipéptido obtenido a partir de TROP-2 de ratón. El número en la posición superior de la vista esquemática de la proteína quimérica indica el número de aminoácidos de una proteína TROP-2 de ratón, y el número de la posición inferior de la misma indica el número de aminoácidos de una proteína hTROP-2.

La Figura 18 muestra los resultados obtenidos mediante la identificación de una región de unión a anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2, usando TROP-2 quimérica de ser humano/ratón. Usando células HEK293, que expresan constantemente cualquier proteína TROP-2 quimérica de ser humano/ratón-C (hmTROP-2-C) o TROP-2-D quimérica de ratón/ser humano (mhTROP-2-D), se estudió la reactividad con los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 mostrada en la figura. Como control negativo, se usó IgG2b de ratón.

La Figura 19 muestra los resultados obtenidos mediante la identificación de la región de unión a anticuerpo de un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2.

Un gen hTROP-2 y cada gen de TROP-2 quimérico de ser humano/ratón se introdujeron en células HEK293, y el análisis de FACS se realizó usando las células, en las que los genes se expresaban de forma transitoria. En la Figura 19(A), se estudió la reactividad de los anticuerpos K5-70, K5-107, T5-86 y K5-116-2-1 con hTROP-2 (caja superior), con hmTROP-2-A (caja media) y con hmTROP-2-B (caja inferior). Como control negativo, se usó IgG2b de ratón. En la Figura 19(B), se estudió la reactividad de anticuerpos T6-4 y T6-16 con hTROP-2 (caja superior), con mhTROP-2-E (caja media) y con mhTROP-2-F (caja inferior). Como control negativo, se usó IgG2b de ratón.

La Figura 20 muestra la expresión de hTROP-2 en tejidos normales humanos. Las matrices de tejido normal humano se inmunotifieron con un clon K5-63-17 de anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2. (A) piel, (B) esófago, (C) riñón (corteza), (D) riñón (médula), (E) páncreas, (F) próstata, (G) vejiga, (H) amígdala, (I) corazón, (J) hígado (aumento: x 200)

La Figura 21 muestra la expresión de hTROP-2 en tejidos cancerosos. Las matrices de tejido de cáncer humano se inmunotifieron con un clon K5-63-17 de anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2. (A) cáncer de mama, (B) cáncer de pulmón, (C) cáncer de esófago, (D) cáncer de estómago, (E) cáncer pancreático, (F) cáncer de colon, (G) cáncer de vejiga, (H) cáncer de próstata, (I) cáncer de ovario (aumento: x 100)

La Figura 22 muestra la actividad antitumoral de un clon K5-70 mediante una sola administración en modelos de prevención de xenoinjerto usando células PK-59.

La Figura 22A muestra el transcurso del tiempo de la formación del tumor en un grupo de control (IgG de ratón ●) y en un grupo de administración de K5-70 (○) (un valor medio  $\pm$  desviación estándar). La flecha indica administración de anticuerpo. \*  $P < 0,05$  (mediante ensayo t de Student), \*\*  $P < 0,01$  (mediante ensayo t de Student).

La Figura 22B muestra el peso del tumor representado de cada ratón en el momento del 28º día (Día 28) (el día final del experimento) en el ensayo de la Figura 22A. \*\*  $P < 0,01$  (mediante ensayo t de Student).

La Figura 22C muestra el transcurso del tiempo de la formación del tumor en cada ratón en un grupo de control (IgG de ratón ●) y en un grupo de administración de K5-70 (○). La flecha indica administración de anticuerpo.

- La Figura 23 muestra la actividad antitumoral de un clon K5-70 en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando células SW480 de cáncer de colon humano.
- La Figura 23A muestra el transcurso del tiempo de la formación del tumor en un grupo de control (IgG de ratón ●) y en un grupo de administración de K5-70 (○) (un valor medio  $\pm$  desviación estándar). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpo. \*\* P < 0,01 (mediante ensayo t de Student).
- La Figura 23B muestra el peso del tumor representado de cada ratón en el momento del 44º día (Día 44) (el día final del experimento) en el ensayo de la Figura 23A. \*\* P < 0,01 (mediante ensayo t de Student).
- La Figura 24 muestra la actividad antitumoral de un clon K5-116-2-1 en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando células SW480.
- La Figura 24A muestra el transcurso del tiempo de la formación del tumor en un grupo de control (IgG de ratón ●) y en un grupo de administración de T6-16 (○) (un valor medio  $\pm$  desviación estándar). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpo. \*\* P < 0,01 (mediante ensayo t de Student).
- La Figura 24B muestra el peso del tumor representado de cada ratón en el momento del 42º día (Día 42) (el día final del experimento) en el ensayo de la Figura 24A. \*\* P < 0,01 (mediante ensayo t de Student).
- La Figura 25 muestra la actividad antitumoral de un clon T6-16 en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando células SW480.
- La Figura 25A muestra el transcurso del tiempo de la formación del tumor en un grupo de control (IgG de ratón ●) y en un grupo de administración de T6-16 (○) (un valor medio  $\pm$  desviación estándar). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpo. \* P < 0,05 (mediante ensayo t de Student).
- La Figura 25B muestra el peso del tumor representado de cada ratón en el momento del 42º día (Día 42) (el día final del experimento) en el ensayo de la Figura 25A. \* P < 0,05 (mediante ensayo t de Student).
- La Figura 26 muestra la actividad antitumoral dependiente de la dosis de un clon K5-70 en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando células SW480.
- La Figura 26A muestra el transcurso del tiempo de la formación del tumor en un grupo de control (IgG de ratón ●) y en un grupo de administración de K5-70 (○: 1 mg/kg,  $\Delta$ : 5 mg/kg,  $\square$ : 10 mg/kg) (un valor medio  $\pm$  desviación estándar). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpo. \* P < 0,05 (mediante ensayo t de Student).
- La Figura 26B muestra el peso del tumor representado de cada ratón en el momento del 42º día (Día 42) (el día final del experimento) en el ensayo de la Figura 26A. \* P < 0,05 (mediante ensayo t de Student).
- La Figura 27 muestra la actividad antitumoral de un clon K5-70 en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando células SW480.
- La Figura 27A muestra la actividad antitumoral de un anticuerpo K5-70 a intervalos de administración de una vez a la semana. Se muestra el transcurso del tiempo de la formación del tumor en un grupo de control (●: IgG de ratón) y en un grupo de administración de K5-70 (○: 10 mg/kg) (un valor medio  $\pm$  desviación estándar). Las puntas de flecha (Días 10, 17, 24, 31, and 38) indican administración de un anticuerpo K5-70. \* P < 0,05 mediante ensayo t de Student.
- La Figura 27B muestra el transcurso del tiempo de la formación del tumor mediante administración de un anticuerpo K5-70 a intervalos de administración de una vez cada diez días (○: q10d) o una vez cada dos semanas ( $\Delta$ : q14d). El círculo cerrado (●) indica un grupo de control (IgG de Ratón, 10 mg/kg) (un valor medio  $\pm$  desviación estándar). Las puntas de flecha rellenas ( $\blacktriangledown$ : Días 9, 19, y 29) y las puntas de flecha no rellenas ( $\nabla$ : Días 9, 23, y 37) indican administración de un anticuerpo K5-70. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 mediante ensayo t de Student.
- La Figura 28 muestra la actividad antitumoral dependiente de la dosis de un clon T6-16 en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando células SW480.
- La Figura 28A muestra el transcurso del tiempo de la formación del tumor en un grupo de control (●: IgG de ratón) y se muestra en un grupo de administración de T6-16 (○: 1 mg/kg,  $\Delta$ : 5 mg/kg,  $\square$ : 10 mg/kg) (un valor medio  $\pm$  desviación estándar). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpo. \*\*P < 0,01 (mediante ensayo t de Student).
- La Figura 28B muestra el peso del tumor representado de cada ratón en el momento del 43<sup>er</sup> día (Día 43) (el día final del experimento) en el ensayo de la Figura 28A. \*\* P < 0,01 (mediante ensayo t de Student).
- La Figura 29 muestra la actividad antitumoral de un clon T6-16 en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando células SW480. El transcurso del tiempo de la formación del tumor en un grupo de control (●: IgG de ratón, 10 mg/kg) y se muestra en un grupo de administración de T6-16 (10 mg/kg) (○: q7d,  $\Delta$ : q10d) (un valor medio  $\pm$  desviación estándar). Las puntas de flecha (Días 10, 17, 24, 31, y 38) y las flechas (Días 10, 20, 30, y 40) indican la administración de un anticuerpo T6-16. La administración se realizó una vez cada tres días con respecto al grupo de control. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 mediante ensayo t de Student.
- La Figura 30 muestra la actividad antitumoral de un clon K5-70 en modelos de prevención de xenoinjerto usando células DU-145 de próstata humana.
- La Figura 30A muestra el transcurso del tiempo de la formación del tumor en un grupo de control (●: IgG de ratón) y en un grupo de administración de K5-70 (○) (un valor medio  $\pm$  desviación estándar). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpo. \* P < 0,05 (mediante ensayo t de Student).
- La Figura 30B muestra el peso del tumor representado de cada ratón en el momento del 40º día (Día 40) (el día final del experimento) en el ensayo de la Figura 30A. \* P < 0,05 (mediante ensayo t de Student).
- La Figura 31 muestra la actividad inhibitoria de metástasis de un clon K5-70 en modelos de metástasis de hígado usando células PK-59.
- Las Figuras 31A y 31B muestran la imagen de hígado extirpado de un grupo de control (IgG de ratón) (A) y un



grupo de administración de K5-70 (B), que se tomaron 6 semanas después del trasplante de células. Las flechas indican focos de metástasis de hígado.

La Figura 32 muestra la actividad antitumoral de K5-70 en modelos de xenoinjerto usando células SW480, que son modelos de cáncer recurrente después de administración de clorhidrato de irinotecán. Esta figura muestra el transcurso del tiempo de la formación del tumor en un grupo no tratado (♦), en un grupo de administración de clorhidrato de irinotecán (40 mg/kg) + K5-70 (○: 10 mg/kg), y en un grupo de administración de clorhidrato de irinotecán (40 mg/kg) + IgG de ratón (●: 10 mg/kg) (un valor medio ± desviación estándar). Las puntas de flecha (Días 11, 14, y 17) indican administración de clorhidrato de irinotecán. El anticuerpo K-70 o la IgG de ratón se administraron una vez cada tres días desde el Día 20. La flecha indica un periodo de administración de anticuerpo. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 mediante ensayo t de Student.

La Figura 33 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de una región variable de cadena H (VH) del clon K5-70 (SEQ ID NO: 34) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 35). En letra cursiva se muestra un péptido señal. La glutamina (Q) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *IYWIN*, *NIYPSDSYTNYNQKFKD*, y *TSMADY*) se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación del NIH N.º 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VH del clon K5-70 se muestran en las SEQ ID NOS: 36 a 38, respectivamente.

La Figura 34 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de una región variable de cadena L (VL) del clon K5-70 (SEQ ID NO: 39) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 40). En letra cursiva se muestra un péptido señal. El ácido aspártico (D) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *RASQSIGTSIH*, *YASESIS*, y *QQSNSWPFT*) se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación del NIH N.º 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VL del clon K5-70 se muestran en las SEQ ID NOS: 41 a 43, respectivamente.

La Figura 35 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de una región variable de cadena H (VH) del clon K5-107 (SEQ ID NO: 44) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 45). En letra cursiva se muestra un péptido señal. La glutamina (Q) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *SYWMH*, *NIYPGGGYTNYDEKFKS*, y *SSYFDY*) se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación del NIH N.º 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VH del clon K5-107 se muestran en las SEQ ID NOS: 46 a 48, respectivamente.

La Figura 36 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de una región variable de cadena L (VL) del clon K5-107 (SEQ ID NO: 49) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 50). En letra cursiva se muestra un péptido señal. El ácido aspártico (D) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *RASQSIGTSIH*, *YASESIS*, y *QQSNSWPFT*) se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación del NIH N.º 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VL del clon K5-107 se muestran en las SEQ ID NOS: 51 a 53, respectivamente.

La Figura 37 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de una región variable de cadena H (VH) del clon K5-116-2-1 (SEQ ID NO: 54) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 55). En letra cursiva se muestra un péptido señal. La glutamina (Q) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *SYWIT*, *NIYPSDSYTNYNQKFRD*, y *LFDY*) se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación del NIH N.º 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VH del clon K5-116-2-1 se muestran en las SEQ ID NOS: 56 a 58, respectivamente.

La Figura 38 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de una región variable de cadena L (VL) del clon K5-116-2-1 (SEQ ID NO: 59) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 60). En letra cursiva se muestra un péptido señal. El ácido aspártico (D) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *RASQSIGTSIH*, *YASESIS*, y *QQSNSWPFT*) se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación del NIH N.º 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VL del clon K5-116-2-1 se muestran en las SEQ ID NOS: 61 a 63, respectivamente.

La Figura 39 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de una región variable de cadena H (VH) del clon T6-16 (SEQ ID NO: 64) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 65). En letra cursiva se muestra un péptido señal. El ácido glutámico (E) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *DYNMH*, *YIYPYNGGTGYNQRFKS*, y *EDYGSSPSYAMDY*) se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación del NIH N.º 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VH del clon T6-16 se muestran en las SEQ ID NOS: 66 a 68, respectivamente.

La Figura 40 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de una región variable de cadena L (VL) del clon T6-16 (SEQ ID NO: 69) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 70). En letra cursiva se muestra un

péptido señal. El ácido aspártico (D) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *RSSQSLVHGNGNTYLH*, *KhSNRFS*, y *SQTTHVPT*) se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, Publicación del NIH N.º 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VL del clon T6-16 se muestran en las SEQ ID NOS: 71 a 73, respectivamente.

### Modo para realizar la invención

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con detalle. Las siguientes descripciones no pretenden limitar el alcance de la presente invención. Además de los siguientes ejemplos, la presente invención se puede modificar y se puede realizar, si fuera apropiado, dentro del intervalo que no altere la intervención de la presente invención

#### 1. Resumen de la presente invención

Como se ha mencionado anteriormente, la TROP-2 humana (hTROP-2) es una sola proteína transmembrana, de membrana de tipo 1 que tiene una longitud completa de 323 restos de aminoácidos. Se ha sabido que un gen de hTROP-2 y un producto genético de la misma se expresan en diversos tipos de células cancerosas.

Como se ha mencionado anteriormente, se ha deseado desarrollar un anticuerpo anti-hTROP-2 humano (un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 humano) o similares con una actividad antitumoral *in vivo* elevada. Bajo tales circunstancias, el presente inventor realizó una identificación sistemática a través de un número de clones extremadamente grande, y como resultado, el inventor tuvo éxito en la obtención de un clon que tenía una actividad antitumoral *in vivo* elevada. de forma específica, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal, que reconoce de forma específica la región extracelular de *hTROP-2 in vivo*, y en particular, un anticuerpo monoclonal que presenta una afinidad elevada en un orden de picomoles (pM). El anticuerpo de la presente invención es extremadamente útil porque es un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2, que presenta una actividad inhibitoria del crecimiento tumoral significativa a una dosis más baja que la del anticuerpo anti-hTROP-2 existente (por ejemplo, a una dosificación de 1/20) cuando se administra de manera individual como un anticuerpo desnudo, y que también presentaba una actividad inhibitoria del crecimiento tumoral significativa en modelos de tratamiento de ratón portador de tumor, en el que se usa en múltiples tipos de células de cáncer humano.

#### 2. Producción del anticuerpo anti-hTROP-2

##### (1) Preparación del antígeno

La información con respecto a la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de hTROP-2 se desvela con el "Número de registro NP\_002344" en la página web de, por ejemplo, NCBI (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La información con respecto a una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) que codifica la secuencia de aminoácidos de hTROP-2 se desvela con el "Número de registro NM\_002353" en la misma página web como se ha descrito anteriormente.

Como un antígeno, se puede usar un polipéptido o péptido (que también se denomina simplemente péptido) que comprende al menos una porción (toda o una parte) de la secuencia de aminoácidos de hTROP-2, y preferentemente, se puede usar un péptido que comprende al menos una porción (toda o una parte) de la secuencia de aminoácidos de la región extracelular de hTROP-2. La región extracelular (incluyendo un péptido señal) de hTROP-2 indica una región que comprende los aminoácidos en las posiciones 1 a 274 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2 (el péptido señal: los aminoácidos en las posiciones 1 a 26). En el presente documento, con respecto a un péptido usado como un antígeno, la descripción "al menos una porción de la secuencia de aminoácidos" mencionada anteriormente no está limitada en particular en términos de longitud. Por ejemplo, son preferentes una región que comprende los aminoácidos en las posiciones 1 a 145 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2, una región que comprende los aminoácidos en las posiciones 146 a 274 de la misma secuencia de aminoácidos como se ha descrito anteriormente, y similares.

Un péptido usado como un antígeno se puede producir ya sea mediante síntesis química, o mediante síntesis de acuerdo con un método de ingeniería genética usando *Escherichia coli* o similares. se puede aplicar un método bien conocido por las personas con experiencia en la materia.

Cuando un péptido se produce mediante síntesis química, éste se puede sintetizar con un método de síntesis de péptidos bien conocido. Además, a la síntesis de péptidos se puede aplicar a un método de síntesis en fase sólida o un método de síntesis en fase líquida. También se puede usar un sintetizador de péptidos disponible en el mercado (por ejemplo, PSSM-8 fabricado por Shimadzu Corporation, etc.).

Cuando un péptido se sintetiza mediante un método de ingeniería genética, en primer lugar, se diseña y se sintetiza el ADN que codifica el péptido. El diseño y la síntesis de un ADN de este tipo se puede realizar de acuerdo con un

método de PCR, usando un vector que comprende un gen de hTROP-2 de longitud completa, o similares como un molde, y también usando cebadores diseñados para ser capaces de sintetizar una región de ADN deseada. A partir de ese momento, el ADN se une a un vector adecuado para obtener un vector recombinante usado para expresión de proteínas, y a continuación este vector recombinante se introduce en un hospedador de modo que un gen de  
 5 interés se puede expresar en el mismo, obteniendo de ese modo un transformante (Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

Como un vector, se usa un fago o un plásmido capaz de replicarse de forma autónoma en un microorganismo hospedador. Además, también se puede usar un virus de animal o un virus de insecto. Para producir un vector  
 10 recombinante, un ADN purificado se puede escindir con enzimas de restricción adecuadas, y la porción de ADN escindida de ese modo se puede insertar a continuación en el sitio de la enzima de restricción o similares de un ADN vector adecuado, con el fin de unirla al vector. El tipo de hospedador usado en la transformación no está limitado en particular, siempre y cuando sea capaz de expresar un gen de interés. Los ejemplos de un hospedador de este tipo incluyen bacterias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, etc.), levaduras, células de animal (células COS, células CHO,  
 15 etc.), células de insecto, e insectos. Como un hospedador de este tipo también se puede usar un mamífero tal como una cabra. Un método para introducir un vector recombinante en un hospedador se conoce públicamente.

El transformante descrito anteriormente se cultiva, y a continuación un péptido usado como antígenos se recoge del cultivo. El término "cultivo" se usa en el presente documento para hacer referencia tanto a (a) un sobrenadante de  
 20 cultivo, como a (b) células cultivadas, una masa celular cultivada o un producto disgregado de las mismas.

Después de finalizar el cultivo, cuando un péptido de interés se produce en una masa celular o en células, el péptido se extrae disgregando la masa celular o las células. Por otro lado, cuando un péptido de interés se produce fuera de una masa celular o fuera de las células, se usa directamente una solución de cultivo, o la masa celular o las células  
 25 se retiran de la solución de cultivo mediante centrifugación o similares. A partir de ese momento, el péptido de interés se puede aislar y purificar con un solo uso de métodos bioquímicos usados comúnmente en el aislamiento y purificación de péptidos, tales como precipitación con sulfato de amonio, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía por afinidad, o mediante combinación de manera apropiada de los métodos bioquímicos mencionados anteriormente.

En la presente invención, un péptido usado como un antígeno también se puede obtener mediante traducción *in vitro* usando un sistema de síntesis sin células. En este caso, se pueden aplicar los métodos, es decir, un método que usa ARN como un molde y un método que usa ADN como un molde (transcripción/traducción). Como tal, se puede  
 30 usar un sistema de síntesis sin células, un sistema disponible en el mercado, tal como el sistema Expressway™ (Invitrogen), PURESYSYSTEM (marca comercial registrada; Post Genome Institute) o el sistema TNT (Marca comercial registrada; Promega).

El péptido obtenido de este modo se puede unir a una proteína vehículo adecuada tal como albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH), tiroglobulina humana o  $\gamma$ -globulina de pollo.  
 40

Además, el antígeno puede ser un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una delección, sustitución o adición de uno o más aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de hTROP-2 (SEQ ID NO: 2) o una secuencia parcial de la misma como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, se puede usar un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos, en la que uno o más (preferentemente uno o varios (por  
 45 ejemplo, 1 a 10, y más preferentemente 1 a 5)) aminoácidos han sufrido delección, o uno o más (preferentemente uno o varios (por ejemplo, 1 a 10, y que más preferentemente 1 a 5)) aminoácidos están sustituidos con otros aminoácidos, o uno o más (preferentemente uno o varios (por ejemplo, 1 a 10, y más preferentemente 1 a 5)) otros aminoácidos se añaden, con respecto a la secuencia de aminoácidos de hTROP-2 o una secuencia parcial de la misma.  
 50

En la presente invención, un gen a introducir en una célula o similar es un gen que codifica una proteína hTROP-2 o un fragmento parcial de la misma, o una proteína mutante de la misma o un fragmento de la misma. Como un gen de este tipo, se puede usar, por ejemplo, un gen que tenga la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia parcial de la misma.  
 55

Además, como un gen a introducir en una célula o similar, también se puede usar una secuencia de nucleótidos que hibride en condiciones astringentes con una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 y que codifica una proteína que tiene actividad de hTROP-2, o una secuencia parcial de la misma.  
 60

La descripción "condiciones astringentes" se usa en el presente documento para hacer referencia a condiciones de lavado después de finalizar la hibridación. Como condiciones astringentes de este tipo, una concentración de sal (sodio) en tampón es de 10 a 500 mM y una temperatura es de 42 °C a 72 °C, y preferentemente, la condición salina mencionada anteriormente es de 50 a 300 mM y una temperatura es de 55 °C a 68 °C.  
 65

En un gen se puede introducir una mutación de acuerdo con un método conocido tal como un método de Kunlcel o

un método de dúplex con huecos, usando, por ejemplo, un kit de introducción de mutación que utiliza mutagénesis dirigida al sitio, tal como el Sistema de Mutagénesis Dirigida al Sitio Gene-Tailor™ (fabricado por Invitrogen) o el Sistema de Mutagénesis Dirigida al Sitio TaKaRa (Mutan-K, Mutan-Super Express Km, etc.; fabricado por Takara Bio Inc.).

5

## (2) Producción del anticuerpo policlonal

El antígeno preparado se administra a un mamífero para inmunización. El tipo de mamífero de este tipo no está limitado en particular. Por ejemplo, se puede usar una rata, un ratón y un conejo, y entre ellos, es preferente un ratón.

10

La dosificación del antígeno por animal se puede determinar, si fuera apropiado, dependiendo de la presencia o ausencia de un adyuvante. Los ejemplos de un adyuvante de este tipo incluyen un adyuvante completo de Freund (FCA), un adyuvante incompleto de Freund (FIA) y un adyuvante de hidróxido de aluminio. La inmunización se puede realizar principalmente mediante inyección del antígeno en la vena, almohadilla de la pata, hipodermis o cavidad abdominal de un animal. Además, el intervalo de inmunización está limitado en particular, y la inmunización se realiza a intervalos de varios días a varias semanas, preferentemente a intervalos de 1 semana, de 1 a 10 veces, y preferentemente 2 o 3 veces. De tres a siete días después del día de la inmunización final, un título de anticuerpo se mide mediante inmunoensayo enzimático (ELISA o EIA), radioinmunoensayo (RIA) u otros métodos. En la fecha en la que se obtiene un título de anticuerpo deseado, la sangre se puede extraer para obtener antisero. En el método descrito anteriormente para recoger un anticuerpo, si fuera necesario purificar el anticuerpo, el anticuerpo se puede purificar seleccionando un método adecuado a partir de los métodos conocidos tales como precipitación con sulfato de amonio precipitation, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel y cromatografía por afinidad, o combinando los métodos mencionados anteriormente, si fuera apropiado. A partir de ese momento, la reactividad de un anticuerpo policlonal en el antisero se mide mediante el método de ELISA o similar.

15

20

25

## (3) Producción del anticuerpo monoclonal

30

### (3-1) Recogida de células productoras de anticuerpo

El anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención no está limitado, pero es preferentemente un anticuerpo monoclonal.

35

El antígeno preparado se administra a un mamífero, tal como una rata, un ratón o un conejo, para inmunización. La dosificación del antígeno por animal se puede determinar, si fuera apropiado, dependiendo de la presencia o ausencia de un adyuvante. En el presente documento se pueden usar los mismos adyuvantes como se ha descrito anteriormente. Además, en el presente documento se pueden aplicar los mismos métodos de inmunización como se ha descrito anteriormente. De uno a sesenta días, y preferentemente, de uno a catorce días después del día de la inmunización final, se recogen las células productoras de anticuerpo. Los ejemplos de células productoras de anticuerpo de este tipo incluyen células esplénicas, células de ganglios linfáticos y células de sangre periférica. Entre estas, son preferentes las células de ganglios linfáticos y células esplénicas.

40

### (3-2) Fusión celular

45

Para obtener hibridomas (una línea celular productora de anticuerpo), se realiza la fusión celular de células productoras de anticuerpo con células de mieloma. Como células de mieloma a fusionar con células productoras de anticuerpo, se pueden usar células establecidas comúnmente disponibles de animales tales como ratones. La línea celular usada en el presente documento es preferentemente una línea celular, que tiene selectividad de fármaco, que no puede sobrevivir en un estado sin fusionar en un medio selectivo de HAT (que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina), y que puede sobrevivir solamente en un estado fusionado con células productoras de anticuerpo.

50

Los ejemplos de células de mieloma incluyen líneas de células de mieloma de ratón tales como P3-X63-Ag8.653, P3-X63-Ag8 (X63), P3-X63-Ag8.U1 (P3U1), P3/NS 1/1-Ag4-1 (NS1) y Sp2/0-Ag14 (Sp2/0). Las células de mieloma se pueden seleccionar, si fuera apropiado, a la vez que se tiene en consideración la compatibilidad con células productoras de anticuerpo.

55

Posteriormente, las células de mieloma se fusionan con células productoras de anticuerpo. Para una fusión celular de este tipo, las células productoras de anticuerpo ( $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células/ml) se mezclan con células de mieloma ( $2 \times 10^5$  a  $2 \times 10^6$  células/ml) en un medio para células animales, tal como DMEM o un medio RPMI-1640 que no contiene suero. La proporción celular entre las células productoras de anticuerpo y las células de mieloma (células productoras de anticuerpo : células de mieloma) no está limitada. En general, la proporción celular es preferentemente 1 : 1 a 10 : 1, y más preferentemente 3 : 1. A partir de ese momento, una reacción de fusión se realiza en presencia de un promotor de fusión celular. Como promotor de fusión celular de este tipo, se puede usar polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio de 1.000 a 6.000 Dalton (D) o similar. Además, también es

60

65

posible fusionar células productoras de anticuerpo con células de mieloma, usando un aparato de fusión celular disponible en el mercado que utiliza estimulación eléctrica (por ejemplo, electroporación).

### (3-3) Selección y clonación de hibridomas

5 Los hibridomas de interés se seleccionan entre las células después del tratamiento de fusión celular. Como un método para seleccionar hibridomas, la suspensión celular se diluye de forma apropiada, por ejemplo, con un medio RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal, y la solución diluida se dispersa a continuación en una placa de microtitulación. A partir de ese momento, a cada pocillo se le añade un medio selectivo. Aunque el medio selectivo se intercambia de forma apropiada por uno recién preparado, se realiza el cultivo. Como resultado, aproximadamente 14 días después del inicio del cultivo en el medio selectivo, las células que crecen a partir del medio selectivo se pueden obtener como hibridomas.

15 Posteriormente, se realiza identificación sistemática para examinar si un anticuerpo que reacciona o no con hTROP-2 está presente en un sobrenadante de cultivo de los hibridomas en crecimiento. La identificación sistemática de hibridomas se puede realizar de acuerdo con un método habitual, y por lo tanto, el método de identificación sistemática no está limitado en particular. Por ejemplo, se recoge una alícuota del sobrenadante de cultivo de los hibridomas en crecimiento contenidos en el pocillo, y de identificación sistemática se realiza a continuación mediante ELISA, EIA, RIA o similares.

20 La clonación de las células fusionadas puede realizar mediante un método de dilución limitante o similar. Un anticuerpo que muestra una reactividad elevada con hTROP-2 se determina mediante citometría de flujo o similar, y a continuación se selecciona un hibridoma que produce este anticuerpo. El hibridoma seleccionados se establece como un clon.

### 25 (3-4) Recogida del anticuerpo monoclonal

30 Como un método para cultivar el hibridoma establecido y a continuación recoger un anticuerpo monoclonal A partir del cultivo obtenido, se puede adoptar un método de cultivo celular común, un método de formación de ascitis o similar. El término "cultivo" se usa en el presente documento para hacer referencia a que se permite que los hibridomas crezcan en una placa de cultivo o un frasco de cultivo, o que se permite que los hibridomas crezcan en la cavidad abdominal de un animal, como se describe a continuación.

35 En el caso del método de cultivo celular, los hibridomas se cultivan en un medio para células animales, tal como un medio RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal al 10 %, un medio MEM o un medio sin suero, en condiciones de cultivo comunes (por ejemplo, 37 °C, concentración de CO<sub>2</sub> al 5 %) de 7 a 14 días, y a partir de ese momento, un anticuerpo se puede obtener a partir del sobrenadante del cultivo.

40 En el caso del método de formación de ascitis, se administran aproximadamente  $1 \times 10^7$  hibridomas en la cavidad abdominal de un animal de la misma especie que el mamífero a partir de que se obtienen células de mieloma, de modo que se permite que proliferen grandes cantidades de hibridomas. A partir de ese momento, de 2 a 3 semanas más tarde, la ascitis preferentemente se recoge.

45 Los métodos de recogida de anticuerpo descritos anteriormente, si fuera necesario purificar el anticuerpo, el anticuerpo se puede purificar seleccionando de forma apropiada un método adecuado a partir de métodos conocidos tales como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel y cromatografía por afinidad, o combinando los métodos mencionados anteriormente.

### 50 (3-5) Selección del clon que tiene actividad antitumoral

El anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención es un anticuerpo que tiene actividad antitumoral *in vivo*.

55 La expresión "actividad antitumoral" se usa en el presente documento para hacer referencia a actividad de eliminación de células tumorales (células cancerosas) o actividad de inhibición de crecimiento tumoral. Los ejemplos precedentes de una actividad tumoral de este tipo incluyen actividad de inhibición del crecimiento de células cancerosas y actividad de inhibición de la angiogénesis tumoral. El tipo de tumor humano (células tumorales), sobre las que el anticuerpo de la presente invención es capaz de presentar actividad antitumoral, incluye diversos tipos de tumores humanos conocidos, en los que se ha confirmado la expresión de hTROP-2. El tipo de un tumor humano de este tipo no está limitado en particular. Por ejemplo, son preferentes uno o dos o más de cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano, y es más preferente el cáncer pancreático humano.

65 Además, el tumor descrito anteriormente puede ser un cáncer recurrente o un cáncer metastásico. El anticuerpo de la presente invención también es capaz de presentar una actividad antitumoral excelente en estos tipos de tumores.

La presencia de actividad antitumoral *in vivo* se puede confirmar, por ejemplo, usando un ratón portador de tumor

(un modelo de xenoinjerto de ratón), en la hipodermis de la que se han trasplantado las células tumorales deseadas, y a continuación administrando al ratón el anticuerpo como se ha obtenido anteriormente. En este caso, el anticuerpo se puede administrar inmediatamente después del trasplante de células tumorales (Modelos de prevención). Como alternativa, se puede administrar después de confirmar que el tumor trasplantado ha alcanzado un volumen determinado previamente (Modelos de tratamiento). El método de administración está limitado. Por ejemplo, el anticuerpo se puede administrar una vez cada tres días, cada semana, cada diez días, o cada dos semanas, o mediante una sola administración (solo una vez), a una dosificación de 5 a 20 mg/kg de peso corporal, mediante administración intraperitoneal o similar. En el caso de modelos de prevención, la presencia o ausencia de actividad antitumoral y el nivel de la misma se pueden evaluar basándose en la frecuencia de la formación del tumor y el volumen tumoral. En el caso de modelos de tratamiento, la presencia o ausencia de actividad antitumoral y el nivel de la misma se pueden evaluar basándose en el volumen tumoral.

Un ejemplo del anticuerpo anti-hTROP-2 que tiene actividad antitumoral *in vivo* es un anticuerpo en el que las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de la cadena H de la misma se muestran en las SEQ ID NOS: 36 a 38, respectivamente, y/o las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de la cadena L de la misma se muestran en las SEQ ID NOS: 41 a 43, respectivamente. En la presente invención, un ejemplo preferente de la región V de la cadena H es una región V de la cadena H que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 35. Un ejemplo preferente de la región V de la cadena L del anticuerpo anti-hTROP de la presente invención es una región V de la cadena L que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 40.

Otro ejemplo del anticuerpo anti-hTROP-2 es un anticuerpo en el que las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de la cadena H de la misma se muestran en las SEQ ID NOS: 46 a 48, respectivamente, y/o las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de la cadena L de la misma se muestran en las SEQ ID NOS: 51 a 53, respectivamente. Un ejemplo de la región V de la cadena H es una región V de la cadena H que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 45. Un ejemplo de la región V de la cadena L es una región V de la cadena L que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 50.

De forma análoga, un ejemplo adicional del anticuerpo anti-hTROP-2 es un anticuerpo en el que las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de la cadena H de la misma se muestran en las SEQ ID NOS: 56 a 58, respectivamente, y/o las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de la cadena L de la misma se muestran en las SEQ ID NOS: 61 a 63, respectivamente. Un ejemplo de la región V de la cadena H es una región V de la cadena H que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 55. Un ejemplo de la región V de la cadena L es una región V de la cadena L que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 60.

De forma análoga, un ejemplo adicional del anticuerpo anti-hTROP-2 es un anticuerpo en el que las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de la cadena H de la misma se muestran en las SEQ ID NOS: 66 a 68, respectivamente, y/o las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de la cadena L de la misma se muestran en las SEQ ID NOS: 71 a 73, respectivamente. Un ejemplo preferente de la región V de la cadena H del anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención es una región V de la cadena H que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 65. Un ejemplo preferente de la región V de la cadena L del anticuerpo anti-hTROP de la presente invención es una región V de la cadena L que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 70.

En la presente invención, de forma más específica, los ejemplos preferentes de un anticuerpo anti-hTROP-2 que tiene actividad antitumoral *in vivo* incluyen: un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (nombre del clon: K5-70) producido por un hibridoma con Número de registro FERM BP-11251; y un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (nombre del clon: T6-16) producido por un hibridoma con Número de registro FERM BP-11346. También se desvelan: un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (nombre del clon: K5-107) producido por un hibridoma con Número de registro FERM BP-11252; un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (nombre del clon: K5-116-2-1) producido por un hibridoma con Número de registro FERM BP-11253; y un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (nombre del clon: T5-86) producido por un hibridoma con Número de registro FERM BP-11254.

En el presente documento, el hibridoma con Número de registro FERM BP-11251 se denominó "Hibridoma de Ratón-Ratón K5-70" y se depositó el 12 de mayo de 2010; el hibridoma con Número de registro FERM BP-11252 se denominó "Hibridoma de Ratón-Ratón K5-107" y se depositó el 12 de mayo de 2010; el hibridoma con Número de registro FERM BP-11253 se denominó "Hibridoma de Ratón-Ratón K5-116-2-1" y se depositó el 12 de mayo de 2010; el hibridoma con Número de registro FERM BP-11346 se denominó "Hibridoma de Ratón-Ratón T6-16" y se depositó el 1 de marzo de 2011; y el hibridoma con Número de registro FERM BP-11254 se denominó "Hibridoma de Ratón-Ratón T5-86" y se depositó el 12 de mayo de 2010. Todos estos hibridoma se depositaron en el International Patent Organism Depository (IPOD), el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, una Institución Administrativa Independiente relacionada con el Ministerio de Economía, Comercio e Industria (el AIST, Tsukuba Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japón, código postal: 305-8566).

Además adicionalmente, otro ejemplo preferente del anticuerpo anti-hTROP-2 es un anticuerpo anti-hTROP-2 que se

une a un sitio (por ejemplo, un epítipo), al que se une (reconoce) un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma que tiene el N.º de registro FERM BP-11251, FERM BP-11252, FERM BP-11253, FERM BP-11346 o FERM BP-11254.

5 Los ejemplos preferentes de un epítipo de este tipo se proporcionarán a continuación en (3-6).

(3-6) Epítipo del anticuerpo anti-hTROP-2

10 El tipo de un epítipo (un determinante antigénico) del anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención no está limitado, siempre y cuando tenga al menos una porción de hTROP-2 como un antígeno. Por ejemplo, un epítipo de este tipo tiene preferentemente al menos una porción de una región formada retirando una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 252 a 260 de la secuencia de aminoácidos de hTROP-2 mostrada en la SEQ ID NO: 2, más preferentemente al menos una porción de una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 1 a 69 o al menos una porción de una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 100 a 274 (excepto para una región que consiste en aminoácidos en la posición 252 a 260), y adicionalmente preferentemente al menos una porción de una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 27 a 69 o una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 109 a 206. Los ejemplos particularmente preferentes del epítipo descrito anteriormente incluyen una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 43 a 65, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 152 a 165, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 171 a 183, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 109 a 120, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 193 a 206, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 43 a 56, y una porción que comprende una región de este tipo, en la secuencia de aminoácidos de hTROP-2 mostrada en la SEQ ID NO: 2. Los ejemplos particularmente preferentes adicionales incluyen una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 43 a 65, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 152 a 165, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 171 a 183, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 109 a 120, y una porción que comprende una región de este tipo. Un anticuerpo anti-hTROP-2, que reconoce las regiones descritas anteriormente (se une a las regiones o porciones descritas anteriormente que comprenden regiones de ese tipo), tiene una actividad de internalización elevada en células tumorales, por ejemplo, y por lo tanto es extremadamente útil como un inmunocnjugado como se describe a continuación.

(3-7) Características del anticuerpo anti-hTROP-2

35 Como se ha descrito anteriormente, el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención es un anticuerpo que tiene una actividad antitumoral *in vivo* elevada a una dosis baja. De forma específica, es preferente que el presente anticuerpo anti-hTROP-2 presente una actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de un 50 % o superior (preferentemente un 80 % o superior, más preferentemente un 90 % o superior, además preferentemente un 95 % o superior, y de forma particularmente preferente casi un 100 % (por ejemplo, un 98 % o superior, o un 99 % o superior)) a una dosis (como un anticuerpo desnudo) de 20 mg/kg de peso corporal o inferior (preferentemente 10 mg/kg de peso corporal o inferior, más preferentemente 5 mg/kg de peso corporal o inferior, y además preferentemente 1 mg/kg de peso corporal o inferior) con respecto a un modelo animal portador de tumor.

45 En el presente documento, la actividad inhibitoria del crecimiento tumoral (%) se puede calcular, por ejemplo, con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral (\%)} = 100 - \left[ \frac{\text{volumen tumoral o peso tumoral del grupo de administración de anticuerpo}}{\text{volumen tumoral o peso tumoral del grupo de control}} \right] \times 100$$

50 Además, el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención tiene preferentemente actividad antitumoral en dos o más tipos de líneas de células tumorales humanas. El tipo de una línea de células tumorales humanas de este tipo no está limitado. Por ejemplo, las líneas de células tumorales humanas de este tipo son al menos dos tipos seleccionados entre el grupo que consiste en diversos tipos de líneas de células de cáncer pancreático humano, líneas de células de cáncer de próstata humano, líneas de células de cáncer de colon humano y líneas de células de cáncer de mama humano. De forma específica, los ejemplos preferentes de las líneas de células tumorales humanas de este tipo incluyen al menos dos tipos seleccionados entre el grupo que consiste en una línea de células de cáncer pancreático humano PK-59, una línea de células BxPC-3 de cáncer pancreático humano, una línea de células de cáncer pancreático humano KP-3L, una línea de células de cáncer pancreático humano KP-2, una línea de células de cáncer pancreático humano PK-1, una línea de células de cáncer pancreático humano PK-45H, una línea de células de cáncer pancreático humano PK-45P, una línea de células de cáncer pancreático humano TCC-PAN2, una línea de células de cáncer pancreático humano SUIT-2, una línea de células de cáncer de colon humano CACO-2, una línea de células de cáncer de colon humano SW480, una línea de células de cáncer de colon humano DLD-1, una línea de células de cáncer de colon humano HCT 116, una línea de células de cáncer de mama humano JIMT-1,

una línea de células de cáncer de mama humano HCC1143, una línea de células de cáncer de mama humano MCF-7, una línea de células de cáncer de próstata humano DU145 y una línea de células de cáncer de próstata humano PC-3. De estos, como los dos o más tipos de líneas de células tumorales humanas descritos anteriormente, son más preferentes la línea de células de cáncer pancreático humano PK-59 y la línea de células BxPC-3 de cáncer pancreático humano.

Además, el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención tiene una constante de disociación (valor de Kd) preferentemente de  $1,0 \times 10^{-10}$  M o inferior, más preferentemente  $1,0 \times 10^{-11}$  M o inferior, y además preferentemente  $1,0 \times 10^{-12}$  M o inferior. En el presente documento, la capacidad de unión (afinidad) del anticuerpo se puede medir en forma de una constante de disociación (valor de Kd), una constante de tasa de disociación (Kdis [1/s]) o una constante de tasa de asociación (Kas [1/M.s]), por ejemplo, mediante análisis de Scatchard o sensor de resonancia de plasmones superficiales denominado Biacore. Como aparatos de Biacore de este tipo, se pueden usar Biacore 3000, Biacore 2000, Biacore X, Biacore J y Biacore Q (todos los cuales poros fabricados por Biacore), por ejemplo. Es preferente que el anticuerpo tenga una constante de disociación (valor de Kd) que sea tan pequeño como sea posible porque podría tener una capacidad de unión elevada (afinidad). El valor de Kd se determina basándose en los dos parámetros de Kdis y Kas, y se puede expresar en la fórmula:  $Kd[M] = Kdis/Kas$ . Como un método para calcular el valor de Kd, se puede adoptar preferentemente el método que se describe en los Ejemplos como se describe a continuación (de forma específica, Ejemplo 10).

#### (4) Anticuerpo y fragmento de anticuerpo genéticamente recombinantes

##### (4-1) Anticuerpo genéticamente recombinante

En una realización preferente del anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención, se proporciona un anticuerpo genéticamente recombinante. El tipo de un anticuerpo genéticamente recombinante de este tipo no está limitado. Los ejemplos incluyen un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, y un anticuerpo humano.

Un anticuerpo quimérico (es decir, un anticuerpo quimérico humanizado) es un anticuerpo formado al unir (conjugan) la región variable de un anticuerpo obtenido a partir de ratón a la región constante de un anticuerpo obtenido a partir de ser humano (por favor hágase referencia a Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851-6855, (1984), etc.). Cuando se produce un anticuerpo quimérico de este tipo, era anticuerpo unido de ese modo se puede construir fácilmente mediante una técnica de recombinación genética.

Cuando se produce un anticuerpo humanizado, una región determinante de la complementariedad (CDR) se trasplanta desde la región variable de un anticuerpo de ratón en la región variable de un anticuerpo humano, con el fin de producir una región variable reconstruida, en la que una región marco conservada (FR) se obtiene a partir del ser humano y CDR se obtiene a partir del ratón (lo que se denomina injerto de CDR (trasplante de CDR)). Posteriormente, la región variable humana reconstruida, humanizada de este modo se une a una región constante humana. Un método de este tipo para producir un anticuerpo humanizado se conoce bien en el presente campo técnico (por favor hágase referencia o véase Nature, 321, 522-525 (1986); J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987); Queen C *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033 (1989); Publicación de Patente de JP (Kohyo) N.º 4-502408 A (1992) (documento de Patente Japonesa N.º 2828340; Queen *et al.*, etc.).

En general, en el caso de un anticuerpo humano (un anticuerpo humano completo), su estructura que comprende una región Hiper Variable que es el sitio de unión al antígeno de una región V, otras partes de la región V, y una región constante es la misma que la estructura del anticuerpo de un ser humano. Sin embargo, un sitio Hiper Variable de este tipo también se puede obtener a partir de otros animales. Una técnica para producir un anticuerpo humano se conoce públicamente, y se ha establecido un método para producir secuencias genéticas que son comunes en seres humanos mediante ingeniería genética. Un anticuerpo humano se puede obtener, por ejemplo, mediante un método que usa un ratón que produce anticuerpo humano que tiene fragmentos de cromosomas humanos que comprenden los genes de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo humano (por favor hágase referencia a Tomizuka, K. *et al.*, Nature Genetics, (1977) 16, 133-143; Kuroiwa, Y. *et al.*, Nuc. Acids Res., (1998) 26, 3447-3448; Yoshida, H. *et al.*, Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects, (1999) 10, 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. e Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers; Tomizuka, K. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2000) 97, 722-727, etc.), o con un método para obtener un anticuerpo humano obtenido a partir de presentación de fago seleccionado entre una biblioteca de anticuerpos humanos (por favor hágase referencia a Wormstone, I. M. *et al.*, Investigative Ophthalmology & Visual Science., (2002) 43 (7), 2301-8; Carmen, S. *et al.*, Briefings in Functional Genomics and Proteomics, (2002) 1 (2), 189-203; Siriwardena, D. *et al.*, Ophthalmology, (2002) 109 (3), 427-431, etc.).

En el caso del anticuerpo quimérico, el anticuerpo humanizado y el anticuerpo humano mencionados anteriormente, la cadena de azúcar unida a N-glucósido en la región Fc del anticuerpo es preferentemente una cadena de azúcar, en la que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor de la misma. Un ejemplo específico es un anticuerpo que consiste en moléculas de anticuerpo genéticamente recombinante, que tiene, en la región Fc de las moléculas de anticuerpo, una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa No se une a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor de la cadena de azúcar unida a N-glucósido a través de un enlace. Un anticuerpo de este tipo es capaz de mejorar de manera significativa la actividad de ADCC.



Este punto (las características de la cadena de azúcar unida a N-glucósido en la región Fc del anticuerpo) también es preferente para el anticuerpo policlonal y el anticuerpo monoclonal mencionados anteriormente.

#### (4-2) Fragmento de anticuerpo

5 El fragmento de anticuerpo anti-hTROP-2 (fragmento parcial) de la presente invención está incluido en el anticuerpo de la presente invención. En el presente documento, el fragmento de anticuerpo de la presente invención tiene actividad de unión a hTROP-2 (es decir, es capaz de unirse a hTROP-2) y también tiene actividad antitumoral *in vivo*, como en el caso del anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención.

10 El fragmento del anticuerpo se refiere a una región de una porción de un anticuerpo policlonal anti-hTROP-2 o anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (es decir, un fragmento de anticuerpo obtenido a partir del anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención). Los anticuerpos de un fragmento de anticuerpo de este tipo incluyen péptidos que comprenden, como al menos una porción del mismo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv (fragmento variable de anticuerpo),  
15 un anticuerpo de una sola hebra (una cadena H, una cadena L, una región V de cadena H, y una región V de cadena L, etc.), scFv, diacuerpo (dímero de scFv), dsFv (una región V estabilizada con disulfuro), y una región determinante de la complementariedad (CDR).

20 El Fab es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 50.000 que tiene actividad de unión a antígeno, que se forma mediante la unión de aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena H a toda la cadena L a través de un enlace disulfuro, entre fragmentos obtenidos mediante tratamiento de moléculas de anticuerpo con una proteasa, papaína. Además, también es posible producir un Fab de este tipo mediante inserción de ADN que codifica el Fab de un anticuerpo en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota, y a continuación introduciendo al vector en un procariota o en un eucariota con el fin de permitir que el  
25 ADN se exprese en el mismo.

30 El F(ab')<sub>2</sub> es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 100.000 que tiene actividad de unión a antígeno, cuyo tamaño es ligeramente superior al de Fab que se une a Fab a través de enlace disulfuro en la región bisagra, entre fragmentos obtenidos mediante tratamiento de moléculas de anticuerpo con una proteasa, pepsina. Además, también es posible producir un F(ab')<sub>2</sub> de este tipo mediante el enlace tioéter o enlace disulfuro de Fab, como se describe posteriormente.

35 El Fab' es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 50.000 que tiene actividad de unión a antígeno, que se forma mediante escisión del enlace disulfuro en la región bisagra del F(ab')<sub>2</sub> mencionado anteriormente. Además, también es posible producir un Fab' de este tipo mediante inserción de ADN que codifica el fragmento de Fab' de un anticuerpo en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota, y a continuación introduciendo al vector en un procariota o en un eucariota con el fin de permitir que el ADN se exprese en el mismo.

40 El scFv es un fragmento de anticuerpo que tiene actividad de unión a antígeno, que es un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH formado mediante unión de una región V de una sola cadena H (VH) a una región V de una sola cadena L (VL) usando un conector peptídico adecuado (P). Un scFv de este tipo se puede producir obteniendo ADNc que codifica VH y VL de un anticuerpo, construyendo ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota, y a continuación introduciendo al vector en un procariota o en un eucariota con el fin de permitir que el ADN se exprese en el mismo.  
45

50 El diacuerpo es un fragmento de anticuerpo formado por dimerización de scFv, que tiene actividades de unión a antígeno divalentes. Las actividades de unión a antígeno divalentes de este tipo pueden ser idénticas entre sí, o también pueden ser diferentes entre sí. Un diacuerpo de este tipo se puede producir obteniendo ADNc que codifica la VH y VL de un anticuerpo, construyendo ADN que codifica scFv de modo que la longitud de la secuencia de aminoácidos de P tiene 8 restos o menos, insertando el ADN en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota, y a continuación introduciendo al vector en un procariota o en un eucariota con el fin de permitir que el ADN se exprese en el mismo.

55 El dsFv es un fragmento de anticuerpo formado mediante unión de polipéptidos, en el que un resto de aminoácido en cada una de VH y VL se ha sustituido con un resto de cisteína, entre sí a través de un enlace disulfuro entre los restos de cisteína. El resto de aminoácido a sustituir con restos de cisteína se puede seleccionar basándose en el cálculo de la estructura tridimensional del anticuerpo de acuerdo con el método de Reiter *et al.*, (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994). Un dsFv de este tipo se puede producir obteniendo ADNc que codifica la VH y VL de un anticuerpo, construyendo ADN que codifica dsFv, insertando el ADN en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota, y a continuación introduciendo al vector en un procariota o en un eucariota con el fin de permitir que el ADN se exprese en el mismo.  
60

65 Un péptido que comprende una CDR comprende al menos una región de las CDR de VH (CDR 1 a 3) y las CDR de VL (CDR 1 a 3). Los ejemplos más preferentes de un péptido de este tipo incluyen un péptido que comprende todas las CDR de VH y un péptido que comprende todas las CDR de VL. Un ejemplo particularmente preferente del

péptido es un péptido que comprende todas las CDR de VH y VL (6 regiones en total). Los ejemplos preferentes de la secuencia de aminoácidos de una CDR de este tipo incluyen las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NOS: 36 a 38, 41 a 43, 46 a 48, 51 a 53, 56 a 58, 61 a 63, 66 a 68, y 71 a 73, como se ha descrito anteriormente.

Un péptido que comprende múltiples CDR se pueden unir entre sí, directamente o a través de un conector peptídico adecuado. Un péptido de este tipo que comprende CDR se puede producir mediante construcción de ADN que codifica la VH y VL de un anticuerpo, insertando el ADN en un vector de expresión procarionota o un vector de expresión eucariota, y a continuación introduciendo al vector de expresión en un procarionota o un eucariota con el fin de permitir que el ADN se exprese en el mismo. Además, un péptido de este tipo que comprende CDR también se puede producir mediante métodos de síntesis química tal como un método de Fmoc (un método de fluorenilmetiloxi-carbonilo) y un método de tBoc (un método de t-butiloxicarbonilo).

El fragmento de anticuerpo de la presente invención, como tal, puede ser un fragmento de anticuerpo, que comprende una parte o toda la región Fc del anticuerpo en la que la fucosa no se une a la N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido. De otro modo, el fragmento de anticuerpo de la presente invención también puede ser una proteína de fusión, momento en el que el fragmento de anticuerpo mencionado anteriormente se fusiona con una parte o toda la región Fc del anticuerpo en la que la fucosa no se une a la N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido. Un fragmento de anticuerpo de este tipo es capaz de mejorar la actividad de ADCC de forma significativa, y por lo tanto es preferente.

En lo sucesivo en el presente documento, en las descripciones de la presente memoria descriptiva, los fragmentos de anticuerpos mencionados anteriormente también están incluidos en el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención.

### 3. Preparación del conjugado de anticuerpo-fármaco

Como un inmunconjugado preparado usando en anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención mencionado anteriormente, se puede proporcionar un conjugado de anticuerpo-fármaco, que comprende el anticuerpo mencionado anteriormente y una sustancia (un compuesto, etc.) que tiene actividad antitumoral y/o actividad de eliminación de células. Se debe indicar que un conjugado formado preparando previamente cada una de las moléculas de anticuerpo mencionado anteriormente y la sustancia mencionada anteriormente que tiene actividad antitumoral y/o actividad de eliminación de células, por separado, y a continuación combinándolos, se denomina generalmente inmunconjugado. Por otro lado, un conjugado obtenido mediante unión de una toxina de proteína usada como una sustancia de este tipo que tiene actividad antitumoral y/o actividad de eliminación de células a un gen de anticuerpo o un gen de acuerdo con una técnica de recombinación genética, con el fin de permitirle que exprese una sola proteína (una proteína de fusión), generalmente se denomina inmunotoxina.

Los ejemplos de una sustancia que tiene actividad antitumoral incluyen doxorubicina, caliqueamicina, mitomicina C, Auristatina E e isótopo radiactivo (RI). Los ejemplos de una sustancia que tiene actividad de eliminación de células incluyen saporina, lisina, exotoxina de pseudomonas, toxina de difteria el isótopo radiactivo (RI). De estos, saporina y exotoxina de pseudomonas se usan preferentemente. El tipo de RI que tiene actividad antitumoral y/o actividad de eliminación de células no está limitado en particular, y los ejemplos de los RI de este tipo incluyen  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{189}\text{Re}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{224}\text{Ac}$ ,  $^{126}\text{I}$ ,  $^{133}\text{I}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{113\text{m}}\text{In}$ ,  $^{95}\text{Ru}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{103}\text{Ru}$ ,  $^{105}\text{Ru}$ ,  $^{107}\text{Hg}$ ,  $^{203}\text{Hg}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{121\text{m}}\text{Te}$ ,  $^{122\text{m}}\text{Te}$ ,  $^{125\text{m}}\text{Te}$ ,  $^{165}\text{Tm}$ ,  $^{167}\text{Tm}$ ,  $^{168}\text{Tm}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{197}\text{Pt}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{143}\text{Pr}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  y  $^{223}\text{Ra}$ .

Un método para producir un conjugado de anticuerpo-fármaco no está limitado. Por ejemplo, se aplica un método para acoplar un anticuerpo con un fármaco a través de un enlace disulfuro o un enlace de hidrazona.

El anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención mencionado anteriormente es excelente en términos de actividad de internalización en células tumorales diana que expresan hTROP-2. Por lo tanto, combinando previamente una sustancia que tiene actividad antitumoral y actividad de eliminación de células con el anticuerpo anti-hTROP-2, llega a ser posible permitir que una sustancia actúe de forma directa y altamente selectiva en las células tumorales. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención es extremadamente excelente en términos de capacidad de suministrar el agente a las células tumorales diana.

La actividad de internalización en células se puede evaluar mediante etiquetado con fluorescencia de un anticuerpo con rodamina o similares a continuación observando el comportamiento migratorio y localización del anticuerpo usando un microscopio de fluorescencia o similares.

Además, en la presente invención, además del conjugado de anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente, También se puede proporcionar un fragmento de conjugado de anticuerpo-fármaco, en el que se usa el fragmento de anticuerpo mencionado anteriormente en lugar de un anticuerpo. Con respecto a los detalles de un fragmento de conjugado de anticuerpo-fármaco de este tipo, se pueden aplicar las descripciones del conjugado de anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente, si fuera apropiado.

En lo sucesivo en el presente documento, en las descripciones de la presente memoria descriptiva, un fragmento de conjugado de anticuerpo-fármaco de este tipo también está incluido en el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención.

#### 5 4. Composición farmacéutica

El anticuerpo anti-hTROP-2 y el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención son útiles como principios activos contenidos en una composición farmacéutica.

10 La composición farmacéutica es útil como una composición farmacéutica para tratar y/o diagnosticar un tumor. En particular, dado que el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención y un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende el anticuerpo mencionado anteriormente tienen actividad inhibitoria del crecimiento tumoral excelente como tal actividad antitumoral, se usan preferentemente en el tratamiento de tumor. Es decir, el anticuerpo anti-hTROP-2 y el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención son útiles como principios activos  
15 contenidos en un agente terapéutico tumoral y en un agente de diagnóstico tumoral. Se debe indicar que el tratamiento del tumor descrito anteriormente incluye inhibición del crecimiento tumoral y supresión del crecimiento tumoral. De forma específica, si se trata de un agente terapéutico tumoral, los ejemplos del agente terapéutico tumoral incluyen un inhibidor del crecimiento tumoral y un supresor del crecimiento tumoral.

20 Es preferente proporcionar la composición farmacéutica de la presente invención en forma de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-hTROP-2 y/o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención como principio o principios activos, y que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar en combinación con agentes antitumorales conocidos. Mediante un uso combinado de este tipo, se puede obtener un efecto antitumoral  
25 más elevado.

Las enfermedades diana (tumores), a las que se aplica la composición farmacéutica de la presente invención, incluyen: los diversos tipos mencionados anteriormente de tumores humanos conocidos, en los que se ha confirmado previamente la expresión de hTROP-2. Entre otros, son particularmente preferentes uno o dos o más  
30 tipos seleccionados entre cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano. La enfermedad llana de este tipo puede ser una sola enfermedad, o dos o más enfermedades que se pueden desarrollar en combinación. Además, el tumor diana puede ser un cáncer recurrente o un cáncer metastásico. La composición farmacéutica de la presente invención (adicionalmente, el anticuerpo anti-hTROP-2 y/o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención) se puede usar de manera eficaz como un  
35 agente terapéutico y un agente de diagnóstico para un cáncer recurrente o un cáncer metastásico.

Los ejemplos del "vehículo farmacológicamente aceptable" incluyen un excipiente, un diluyente, un prolongador de cadena, un agente disgregante, un estabilizante, un conservante, un tampón, un emulsionante, un agente aromático, un agente colorante, un edulcorante, un espesante, un agente corrector, un agente solubilizante y otros  
40 aditivos. Usando uno o más tipos de tales vehículos, se puede preparar una composición farmacéutica en forma de una inyección, un agente líquido, una cápsula, una suspensión, una emulsión, un jarabe, etc. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral o por vía parenteral. Otra forma de administración parenteral es, por ejemplo, una inyección que comprende uno con más principios activos, que se prepara mediante un método habitual. Una inyección de este tipo se puede producir disolviendo o suspendiendo el anticuerpo presente en un  
45 vehículo farmacológicamente aceptable tal como una solución salina normal o un agua destilada disponible en el mercado usada para inyección.

En particular, cuando un fragmento de anticuerpo obtenido a partir del anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención (en particular, un fragmento de anticuerpo con un peso molecular bajo) se administra en un organismo  
50 vivo, se puede usar un sistema de dispersión coloidal además de los componentes mencionados anteriormente. Se anticipa que un sistema de dispersión coloidal de este tipo tiene un efecto de aumento de la estabilidad de un compuesto (un fragmento de anticuerpo) en un organismo vivo o un efecto de transporte de un compuesto de este tipo de manera eficaz a un órgano, tejido, o célula específicos. El tipo de uno de tales sistemas de dispersión coloidal no está limitado, siempre y cuando se usa comúnmente. Los ejemplos de un sistema de dispersión coloidal de este  
55 tipo incluyen sistemas de dispersión que comprenden, como bases, polietilenglicol, un conjugado macromolecular, un agregado macromolecular, una nanocápsula, microesfera, perlas, y lípidos que incluyen un agente emulsionante de aceite en agua, micela, micela mixta y liposoma. Los ejemplos preferentes de un sistema de dispersión coloidal de este tipo incluyen múltiples liposomas y las vesículas de membrana artificial, que tienen un efecto de transporte de manera eficaz de un compuesto de este tipo a un órgano, tejido o célula específicos (Mannino *et al.*,  
60 *Biotechniques*, 1988, 6, 682; Blume y Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1990, 1029, 91; Lappalainen *et al.*, *Antiviral Res.*, 1994, 23, 119; Chonn y Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, 698).

La dosificación de la composición farmacéutica de la presente invención difiere dependiendo de la edad, sexo, peso corporal y síntomas de un paciente, efectos terapéuticos, un método de administración, un tiempo de tratamiento, los  
65 tipos del anticuerpo anti-hTROP-2 y conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención contenidos en la composición farmacéutica, etc. En general, la presente composición farmacéutica se puede administrar dentro del

intervalo entre 600 µg y 6.000 mg por adulto por administración. Sin embargo, la dosis no se limita al intervalo mencionado anteriormente.

5 En un caso en el que la composición farmacéutica se administra en forma de una inyección, por ejemplo, se puede administrar a una dosificación de 100 µg a 100 mg, por administración, por peso corporal de un paciente humano, de una vez o divididas en varias administraciones, como una dosis diaria promedio. Preferentemente, la composición farmacéutica se puede administrar una vez cada tres días, una vez a la semana, una vez cada diez días, o una vez cada dos semanas, o mediante una sola administración (momento en el que el número total de administraciones es 1). Los ejemplos de la forma de clasificación incluyen inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intradérmica, inyección intramuscular e inyección intraperitoneal. Entre estas, es precedente la inyección intravenosa. Además, una inyección de este tipo se puede preparar en forma de un diluyente no acuoso (por ejemplo, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, alcoholes tales como etanol, etc.), una suspensión, o una emulsión. Una inyección de este tipo se puede esterilizar mediante esterilización mecánica usando un filtro, la mezcla de un microbicida, etc. La inyección se puede producir en forma de una inyección a preparar antes de su uso. Es decir, una composición sólida esterilizada se prepara mediante un método de liofilización o similar, y la composición a continuación se disuelve en agua destilada esterilizada usada para inyección u otros disolventes antes de su uso, de modo que se pueda usar a continuación.

20 La presente invención proporciona un uso del anticuerpo anti-hTROP-2 y/o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, mencionados anteriormente en la producción de un agente farmacéutico (un fármaco) para tratar y/o diagnosticar un tumor. Además, la presente invención proporciona el anticuerpo anti-hTROP-2 y/o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, mencionados anteriormente, que se usan para tratar y/o diagnosticar un tumor.

25 Además, la presente invención proporciona un método para tratar y/o diagnosticar un tumor, que se caracteriza por que comprende el uso (en particular, la administración a pacientes) del anticuerpo anti-hTROP-2 y/o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención mencionados anteriormente. Además, la presente invención también proporciona el uso del anticuerpo anti-hTROP-2 y/o conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención, mencionados anteriormente en el tratamiento de tumor.

### 30 5. Método para detectar tumores

El método para detectar un tumor de la presente invención se caracteriza por que comprende permitir que el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención mencionado anteriormente reaccione con una muestra recogida de un organismo vivo (denominada en lo sucesivo en el presente en un documento muestra biológica), y detecta una señal(es) del anticuerpo que reacciona.

40 Como se ha descrito anteriormente, se ha confirmado que hTROP-2 se expresa de forma específica en diversos tipos de células tumorales. Por lo tanto, hTROP-2, y en particular, se puede usar hTROP-2 libre (una porción de la región extracelular de hTROP-2) como un marcador para diversos tipos de tumores. En particular, tal hTROP-2 se puede usar preferentemente como un marcador para cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano.

45 Por lo tanto, se permite que el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención reaccione con una muestra biológica, y a continuación se detecta una señal del anticuerpo que reacciona, con el fin de detectar un tumor. La señal de anticuerpo obtenida se puede usar como un indicador de la cantidad de un antígeno en la muestra biológica (es decir, una cantidad de hTROP-2 o una cantidad de hTROP-2 libre). En la detección de un tumor usando el anticuerpo de la presente invención, en primer lugar, se permite que una muestra biológica recogida como un analito de un sujeto, tal como una sección de tejido o sangre usada como una diana de ensayo, se una al anticuerpo de la presente invención mediante una reacción de antígeno-anticuerpo. Posteriormente, basándose en los resultados de la medición de la cantidad del anticuerpo unido, se mide la cantidad de un antígeno de interés contenido en la muestra biológica. Esta medición se puede realizar de acuerdo con métodos de inmunoensayo conocidos. Por ejemplo, se puede usar un método de inmunoprecipitación, un método de inmunoaglutinación, radioinmunoensayo, Inmunofelometría, un método de transferencia de Western, citometría de flujo y similares. En radioinmunoensayo, se usa un anticuerpo etiquetado, y por lo tanto una señal de anticuerpo se expresa como la cantidad del anticuerpo etiquetado y se detecta directamente. De otro modo, un anticuerpo cuya concentración o título de anticuerpo se ha conocido se puede usar como una solución patrón, y por lo tanto una señal del anticuerpo diana se puede expresar como un valor relativo. Es decir, tanto la solución patrón como el analito se pueden medir usando un dispositivo de medición, y una señal de anticuerpo en una muestra biológica se puede expresar como un valor relativo al valor de la solución patrón usada como un criterio. Los ejemplos de un radioinmunoensayo de este tipo incluyen el método de ELISA, el método de EI, el método de RIA, inmunoensayo de fluorescencia (FIA), e inmunoensayo de luminiscencia. Entre estos, el método de ELISA es particularmente preferente porque es sencillo y altamente sensible.

65 En la presente invención, el estado de un tumor se puede evaluar o diagnosticar, usando el resultado de detección obtenido con el método de detección mencionado anteriormente como un indicador. Por ejemplo, cuando el resultado de detección supera un valor patrón determinado previamente, el estado de un tumor se define como

positivo para tumor, y cuando el resultado de detección es menor que el valor patrón determinado previamente, se define como negativo para tumor. En el caso del positivo para tumor, se determina que se podría haber desarrollado un cierto tipo de tumor, y por lo tanto el estado tumoral se puede evaluar. La expresión "el estado de un tumor" se usa en el presente documento para hacer referencia a la presencia o ausencia del desarrollo de un tumor, o el grado de progresión del mismo. Por lo tanto, los ejemplos específicos del estado de un tumor incluyen presencia o ausencia del desarrollo de un tumor, el grado de progresión del mismo, el grado de malignidad, la presencia o ausencia de metástasis, y la presencia o ausencia de recurrencia.

En la evaluación mencionada anteriormente, como un estado de un tumor a evaluar, solamente un estado se puede seleccionar entre los ejemplos mencionados anteriormente, o múltiples ejemplos se pueden combinar y seleccionar. La presencia o ausencia de un tumor se puede evaluar mediante la determinación de si el tumor se ha desarrollado o no, con referencia al valor patrón determinado previamente usado como un límite, basándose en el resultado de detección obtenido. El grado de malignidad se usa como un indicador que indica el grado de progresión de un cáncer. Basándose en el resultado de detección, el tumor diana se puede clasificar en un cierto estadio de enfermedad y se puede evaluar. De otro modo, un cáncer inicial y un cáncer avanzado se pueden distinguir entre sí, y a continuación se pueden evaluar. Por ejemplo, también es posible determinar el tumor diana como un cáncer inicial o un cáncer avanzado, usando el resultado de detección como un indicador. La metástasis del tumor se puede evaluar determinando si ha aparecido o no una neoplasia en un sitio alejado de la posición de la lesión inicial, usando el resultado de detección como un indicador. La recurrencia se puede evaluar determinando si el resultado de detección ha superado o no el valor patrón determinado previamente de nuevo después del estadio de intervalo o remisión.

#### 6. Kit para detectar o diagnosticar tumores

El anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención se puede proporcionar en forma de un kit para detectar o diagnosticar un tumor. El kit de la presente invención comprende una sustancia de etiquetado, un reactivo en fase sólida sobre el que se ha inmovilizado el anticuerpo o el anticuerpo etiquetado, etc., así como el anticuerpo mencionado anteriormente. Una sustancia de etiquetado que etiqueta el anticuerpo se refiere a una sustancia etiquetada con una enzima, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto quimioluminiscente, etc. El kit de la presente invención también puede comprender otros reactivos usados para realizar la detección de la presente invención, además de los elementos componentes mencionados anteriormente. Por ejemplo, cuando una sustancia de etiquetado de este tipo es una sustancia de etiquetado enzimática, el kit de la presente invención puede comprender un sustrato enzimático (un sustrato cromogénico, etc.), una solución de disolución de sustrato enzimático, una solución de parada de reacción enzimática, un diluyente usado para analitos, etc. Además, el presente kit puede comprender adicionalmente diversos tipos de tampones, agua esterilizada, diversos tipos de recipientes de cultivo celular, diversos tipos de reactores (un tubo Eppendorf, etc.), un agente del bloqueo (un componente de suero tal como albúmina de suero bovino (BSA), leche desnatada, o suero de cabra), un agente de lavado, un agente tensioactivo, diversos tipos de placas, un agente antiséptico tal como azida sódica, un manual de operación experimental (instrucciones), etc.

El kit de la presente invención se puede usar de manera eficaz para realizar el método de detección de la presente invención mencionado anteriormente, y por lo tanto es extremadamente útil.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá de forma más específica en los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

#### [Ejemplo 1]

[Clonación del gen hTROP-2]

Un gen hTROP-2 de longitud completa se aisló de hígado fetal humano (embrión de 10 semanas de edad) de acuerdo con un método de RT-PCR. En primer lugar, los siguientes cebadores de PCR se diseñaron basándose en la secuencia de un gen hTROP-2 (N.º de registro en Genbank NM\_002353).

Cebador directo: 5'-ttcctccgccccaccatggc-3' (SEQ ID NO: 3)  
Cebador inverso: 5'-ctcgagcaagctcggctcctttctc-3' (SEQ ID NO: 4)

Quando se diseñaron estos cebadores, una secuencia digerida con enzima de restricción *XhoI* excepto para un codón de finalización se añadió al cebador inverso. El ADNc se sintetizó a partir de ARN total (TAKARA) preparado a partir de hígado fetal humano (embrión de 10 semanas de edad). Usando este ADNc como un molde, una reacción de PCR se realizó con los cebadores mencionados anteriormente. A partir de ese momento, se realizaron desarrollo mediante electroforesis en gel de agarosa y extracción de una banda de interés, y a continuación se clonó en un vector pCRII (Invitrogen) (pCRII-hTROP-2). El ADNc de hTROP-2 clonado se confirmó por secuenciación.

Un vector de expresión se construyó escindiendo un fragmento de *EcoRI/XhoI* que comprendía un gen hTROP-2 de pCRII-hTROP-2, y a continuación insertando el fragmento en el sitio *EcoRI/XhoI* de un vector pcDNA4/*myc*-His© A

(Invitrogen) (pcDNA4-hTROP-2-*myc*/His). Además, un fragmento de *HindIII*/*PmeI* que comprendía un gen hTROP-2 se recortó de pcDNA4-hTROP-2-*myc*/His (en el que la porción de escisión de *HindIII* tenía extremos romos), y a continuación el fragmento se insertó en un sitio *PmeI* de un vector pcDNA3.1 (+) (Invitrogen), con el fin de construir un vector de expresión que comprendía un gen de resistencia a neomicina (pcDNA3.1-hTROP-2-*myc*/His).

5

**[Ejemplo 2]**

[Construcción de una línea celular capaz de expresar el gen hTROP-2 de forma estable]

10 El vector de expresión (pcDNA3.1-hTROP-2-*myc*/His) que codifica el ADNc de longitud completa de hTROP-2, que se había producido con el método descrito anteriormente, se introdujo en células HEK293 (RIKEN), células HuH-7 (HSRRB), células 7E2-C (descritas en el documento WO 2005/052156) y células CHO-K1 (HSRRB), usando un reactivo de lipofectamina 2000 (Invitrogen), y a continuación la selección se realizó usando un antibiótico G418 (geneticina; GIBCO BRL). A partir de ese momento, se estableció y se obtuvo una línea celular, que expresaba hTROP-2 de forma estable.

15

**[Ejemplo 3]**

[Producción de proteína recombinante de región extracelular de hTROP-2]

20

Un fragmento genético que codifica una porción de la región extracelular de hTROP-2 (de forma específica, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 1 a 263 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2) se amplificó con un método de PCR. En la amplificación se usaron los siguientes cebadores.

25

Cebador directo: 5'-ttcctccgccccaccatggc-3' (SEQ ID NO: 3)

Cebador inverso: 5'-ctcgagctcgccaggaatagatgagcg-3' (SEQ ID NO: 5)

En esta operación, una secuencia digerida con enzima de restricción *XhoI* se añadió al cebador inverso. El fragmento de ADN amplificado con el método de PCR se desarrolló mediante electroforesis en gel de agarosa, y a continuación se purificó usando el Kit de Extracción en Gel (QIAGEN) QIAquick (marca comercial registrada). El fragmento de ADN purificado se subclonó en un vector pCR Blunt (Invitrogen) (pCRB-hTROP-2 EC), y la secuencia genética se confirmó. Posteriormente, un fragmento de *EcoRI*/*XhoI* que comprendía el fragmento genético codificante de la región extracelular de hTROP-2 se recortó del pCRB-hTROP-2 EC, y a continuación se insertó en el sitio *EcoRI*/*XhoI* de un vector pcDNA4/*myc*-His© A (Invitrogen) (pcDNA4mH-hTROP-2 EC). Además, para producir un sitio de restricción enzimática de *NruI*, los siguientes oligonucleótidos se asociaron y se insertaron en el sitio *BamHI*/*EcoRI* del pcDNA4mH-hTROP-2 EC.

30

Oligonucleótido 1: 5'-gatccactagtgcgagtggtgg-3' (SEQ ID NO: 6)

Oligonucleótido 2: 5'-aattccaccactcgcgactagt-3' (SEQ ID NO: 7)

40

De forma análoga, un conector pBgl II (TAKARA) se insertó en el sitio *PmeI* del pcDNA4mH-hTROP-2 EC (pcDNA4mH-NB-hTROP-2 EC). Para producir una proteína recombinante usando baculovirus, un fragmento de *NruI*/*BglII* que comprendía el fragmento genético codificante de la región extracelular de hTROP-2 se recortó del pcDNA4mH-NB-hTROP-2 EC, y a continuación se insertó en el sitio *NruI*/*BglII* de un vector pPSC8 (Nosan Corporation) (pPSC8-hTROP-2 EC). La producción de la proteína recombinante de la región extracelular de hTROP-2 usando baculovirus se delegó a Nosan Corporation.

45

La proteína recombinante de la región extracelular de hTROP-2 se purificó como sigue a continuación. Se añadió Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Biosciences) a un sobrenadante de cultivo que comprendía la proteína recombinante, de modo que se permitió que se unieran entre sí a 4 °C durante 2 horas. A partir de ese momento, el producto resultante se lavó con un tampón de fosfato que contenía imidazol 20 mM, usando EconoColumn (BIO RAD), y a continuación se eluyó con un tampón de fosfato que contenía imidazol 300 mM, de modo que se purificó.

50

**[Ejemplo 4]**

55

[Aislamiento de ADNc de EpCAM humana y construcción del vector de expresión]

Un gen EpCAM humano de longitud completa se aisló a partir de hígado fetal humano (embrión de 10 semanas de edad) de acuerdo con un método de RT-PCR. En primer lugar, los siguientes cebadores de PCR se diseñaron basándose en la secuencia de un gen EpCAM humano (N.º de registro en Genbank NM\_002354).

60

Cebador directo: 5'-tcctcgtgtcccactcccgg-3' (SEQ ID NO: 8)

Cebador inverso: 5'-ctcgagtgcatgagttccctatgc-3' (SEQ ID NO: 9)

65

Cuando se diseñaron estos cebadores, una secuencia digerida con enzima de restricción *XhoI* excepto para un codón de finalización se añadió al cebador inverso. El ADNc se sintetizó a partir de ARN total (TAKARA) preparado a

partir de hígado fetal humano (embrión de 10 semanas de edad). Usando este ADNc como un molde, una reacción de PCR se realizó con los cebadores mencionados anteriormente. A partir de ese momento, se realizaron desarrollo mediante electroforesis en gel de agarosa y extracción de una banda de interés, y a continuación se clonó en un vector pCRII (Invitrogen) (pCRII-hEpCAM). El ADNc de EpCAM humano clonado se confirmó por secuenciación.

Un vector de expresión se construyó escindiendo un fragmento de *EcoRI/XhoI* que comprendía un gen EpCAM humano de pCRII-hEpCAM, y a continuación insertando el fragmento en el sitio *EcoRI/XhoI* de un vector pcDNA4/*myc*-His<sup>®</sup> A (Invitrogen) (pcDNA4-hEpCAM-*myc*/His). Además, un fragmento de *HindIII/PmeI* que comprendía un gen EpCAM humano se recortó de pcDNA4-hEpCAM-*myc*/His (en el que la porción de escisión de *HindIII* tenía extremos romos), y a continuación el fragmento se insertó en un sitio *PmeI* de un vector pcDNA3.1 (+) (Invitrogen), con el fin de construir un vector de expresión que comprendía un gen de resistencia a neomicina (pcDNA3.1-hEpCAM-*myc*/His).

### [Ejemplo 5]

[Producción del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2]

Como agentes inmunógenos, se usaron líneas celulares capaces de expresar hTROP-2 de forma estable (células HEK293-hTROP-2, células CHO-K1-hTROP-2 y células 7E2-C-hTROP-2); línea de células de cáncer pancreático expresan de forma endógena una proteína hTROP-2 en la superficie celular (PK-59, RCB1901; adquirida en el banco de células RIKEN); y la proteína recombinante de la región extracelular de hTROP-2 producida con el método descrito anteriormente.

En el caso de las líneas celulares capaces de expresar hTROP-2 de forma estable, se usaron  $1 \times 10^7$  células, y en el caso de la proteína hTROP-2 recombinante, se usaron 20  $\mu$ g de la proteína. Las líneas celulares por la proteína recombinante se mezclaron con un adyuvante TiterMax Gold (Funakoshi Corporation) a una proporción de mezcla de 1 : 1, con el fin de preparar una emulsión. A continuación la emulsión se inyectó en las dos almohadillas de las patas o cavidad abdominal de un ratón (C57/BL6, Balb/c) (inmunización inicial). Cuando la inmunización se realizaba por inyección en las dos almohadillas de las patas durante un breve periodo de tiempo, se realizó una estimulación de tres a diez días después de la inmunización inicial. El día después de la inmunización final, los ganglios linfáticos se recogieron de ambas rodillas, y a continuación se prepararon linfocitos. Cuando la inmunización se realizaba mediante inyección en la cavidad abdominal durante un periodo de tiempo largo, las estimulaciones se realizaban a intervalos de una vez a la semana después de la inmunización final (en la que las estimulaciones se realizaron de 1 a 2 meses). A partir de ese momento, los linfocitos B se aislaron del bazo de acuerdo con un método habitual. En el caso de inmunización usando células como agentes inmunógenos, para las estimulaciones se usó una suspensión celular de PBS que contenía  $5 \times 10^6$  células. En el caso del uso de una proteína como un agente inmunógeno, se usaron 5  $\mu$ g de una solución de PBS.

Los linfocitos preparados se mezclaron con una línea de células de mieloma de ratón (P3-X63-Ag8.653) a una proporción de mezcla de 3 : 1, y a continuación la fusión celular se llevó a cabo de acuerdo con un método con polietilenglicol. A partir de ese momento, las células fusionadas se cultivaron de 7 a 28 días en un medio de metil celulosa (nombre comercial: Medio D de Clonación ClonaCell-HY; Células Madre), que contenía HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina). Cada una de las colonias individuales de hibridomas en crecimiento se seleccionaron y se colocaron en una placa de fondo plano de 96 pocillos, y usando un medio selectivo líquido que contenía HAT, los hibridoma se cultivaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 %. Un sobrenadante de cultivo de hibridomas en crecimiento De colonias individuales se sometió a una identificación sistemática primaria a través de ELISA Celular (que se describe posteriormente) y a continuación a una identificación sistemática secundaria a través de análisis de FACS usando células HuH-7-hTROP-2, PK-59, estableciendo de ese modo 300 tipos de hibridomas, que producen anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 que reconocen proteínas hTROP-2 expresadas en la superficie celular de células vivas.

### [Ejemplo 6]

[Identificación sistemática primaria usando ELISA Celular]

Las células CHO-K1 (control negativo para hTROP-2; adquiridas en Japan Health Sciences Foundation) y las células CHO-K1-hTROP-2 (o células HUH-7 (control negativo para hTROP-2; adquiridas en Japan Health Sciences Foundation) y células HuH-7-hTROP-2) se inocularon de forma alternativa en una placa de cultivo de 96 pocillos (BD Falcon) a una densidad celular de  $3 \times 10^4$  células/pocillo, y a continuación las células se cultivaron en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C de 1 a 2 días. El medio de cultivo celular se retiró por decantación. A partir de ese momento, las células se lavaron con PBS enfriado con hielo, y a continuación se trataron con paraformaldehído al 4 %-PBS durante 5 minutos, de modo que las células se inmovilizaron. Las células se lavaron con PBS que se había enfriado el hielo, y a continuación se preparó una placa de ELISA. A partir de ese momento, el ELISA se realizó de acuerdo con un método habitual. A continuación se describirán los procedimientos específicos.

En primer lugar, el bloqueo con una solución de leche desnatada al 2 %-PBS se realizó a temperatura ambiente de

30 minutos a 1 hora. Posteriormente, el sobrenadante del cultivo de hibridoma se añadió a la misma, y a continuación se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. A partir de ese momento, el producto resultante se lavó con una solución de Tween 20 al 0,1 %-PBS tres veces. Como un anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón etiquetado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (GE Healthcare Biosciences), que se había diluido  
 5 1000 veces con una solución de bloqueo, se añadió al producto resultante, y a continuación se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. A partir de ese momento, el producto resultante se lavó con una solución de Tween 20 al 0,1 %-PBS tres veces. . Una solución de sustrato de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina: SIGMA) se añadió a la solución de reacción para llevar a cabo una reacción de color, y a continuación la reacción se terminó añadiendo ácido sulfúrico 1 M. A partir de ese momento, la absorbancia (405 nm) se midió usando el Modelo 550 de un lector de microplacas (BIO RAD). Los hibridomas correspondientes a un sobrenadante de cultivo de hibridoma que presentaban un valor de absorbancia elevado con respecto al control negativo se sometieron a un cultivo a gran escala en una placa de fondo plano de 24 pocillos, y a continuación se sometieron a una identificación sistemática secundaria usando análisis de FACS.

#### 15 [Ejemplo 7]

[Identificación sistemática secundaria usando análisis de FACS]

Los hibridomas, que se encontró que eran positivos en la identificación sistemática primaria descrita anteriormente usando ELISA Celular, se sometieron a una identificación sistemática secundaria usando análisis de FACS. En la evaluación de las células de hibridoma, las células HuH-7, que eran células de cáncer de hígado humano que no expresaban hTROP-2, se usaron como células de control negativo y como un indicador se usó la reactividad con células HuH-7-hTROP-2, que expresaban hTROP-2 de forma estable. A continuación, la evaluación se realizó basándose en la reactividad con células PK-59 (RCB1901; adquiridas en el banco celular de RIKEN), que eran  
 20 células de cáncer pancreático humano que expresaban de forma endógena una proteína hTROP-2 En la superficie celular.

Las células se retiraron de la placa de cultivo mediante un tratamiento con tripsina, y a continuación se preparó una suspensión celular (densidad celular:  $2 \times 10^6$  células/ml). El sobrenadante del cultivo de hibridoma, que se presentaba como positivo en la identificación sistemática primaria usando ELISA Celular, se hizo reaccionar con 100  $\mu$ l de la suspensión celular a 4 °C durante 20 minutos. La mezcla de reacción se lavó con PBS, y a continuación se hizo reaccionar con IgG de ratón etiquetado con PE (BD Pharmingen) (0,1  $\mu$ g) (4 °C, 30 minutos). A partir de ese momento, la mezcla de reacción se analizó usando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

35 Por último, se establecieron aproximadamente 300 tipos de hibridomas, que producen un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 que reconoce una proteína hTROP-2 expresada en la superficie celular de células vivas.

#### [Ejemplo 8]

40 [Identificación de isotipo]

El isótopo del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 producido se identificó usando el KIT DE ENSAYO DE FORMACIÓN DE ISOTIPOS DE ANTICUERPO MONOCLONAL DE RATÓN (Serotec) de acuerdo con un método incluido en el kit mencionado anteriormente.

45

#### [Ejemplo 9]

[Formación de ascitis y purificación del anticuerpo TROP-2]

50 Los clones de hibridoma producidos con el método descrito anteriormente se administraron a una densidad de  $3 \times 10^6$  clones en la cavidad abdominal de un ratón atímico BALB/c, al que previamente (siete días antes) se le había administrado 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (pristano). Dos semanas más tarde, la ascitis se recogió. Además, esta ascitis se sometió a precipitación con ácido caprílico, y a continuación a purificación por afinidad usando una columna de proteína G (proteína G HiTrap; GE Healthcare Biosciences) o una columna de proteína A (proteína A HiTrap; GE Healthcare Biosciences), con el fin de obtener anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 de clones de hibridoma individuales.

#### [Ejemplo 10]

60 [Medición de afinidad de unión a antígeno (medición del valor de Kd)]

La afinidad de unión a antígeno (valor de Kd) del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 generado se calculó con un método que usa ELISA (Djavadi-Ohanian L. *et al* (1996), En *Antibody Engineering*, Capítulo 4, pp. 77-97. IRL Press, Oxford).

65

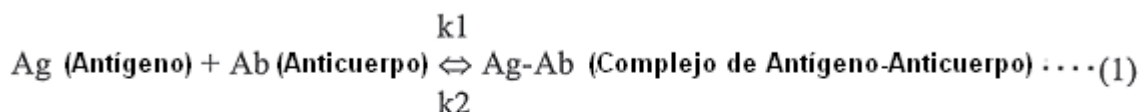
De forma específica, la proteína hTROP-2 recombinante purificada (0,1  $\mu$ g/ml) se añadió a una placa de cultivo de



96 pocillos (Corning) de modo que el antígeno se preparaba en fase sólida (a temperatura ambiente durante 1 hora, o a 4 °C durante una noche). Posteriormente, el producto resultante se lavó con PBS tres veces, y a continuación se añadió leche desnatada al 2 % (solución de PBS) al mismo para bloquearlo (a temperatura ambiente durante 1 hora). El producto resultante se lavó con PBS dos veces. A partir de ese momento, un complejo de antígeno-anticuerpo que se había formado previamente mezclando una solución de antígeno (una proteína hTROP-2 purificada; 50, 25, 12,5, 6,25, o 3,125 nM) con cada clon (0,5 nM) del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 y a continuación equilibrando la mezcla, se añadió a la placa de ELISA descrita anteriormente, y a continuación se hicieron reaccionar (a temperatura ambiente durante 1 hora). El producto de reacción se lavó con PBS tres veces, y a continuación se hizo reaccionar con anti-IgG de ratón etiquetado con HRP (concentración final: 1 µg/ml) (GE Healthcare Biosciences) diluido con una solución de bloqueo (a temperatura ambiente durante 1 hora). Posteriormente, el producto de reacción se lavó con una solución de Tween 20 al 0,1 %-PBS tres veces, y a continuación se añadió una solución de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina: SIGMA) para llevar a cabo una reacción de color. A continuación, se añadió ácido sulfúrico 1 M al producto de reacción para terminar la reacción. La absorbancia se midió usando el Modelo 550 de un lector de microplacas (BIO RAD).

Para medir la constante de disociación (Kd) se usaron las siguientes expresiones de cálculo.

De acuerdo con la ley de acción de masas, una reacción de antígeno-anticuerpo se representa con las siguientes expresiones.



$$Kd = k2/k1 = \text{Antíg libre} \times \text{Antic libre} / Ag-Ab = \text{Antíg libre} \times \text{Antic libre} / x \dots (2)$$

En la expresión (2), Antíg libre representa la concentración de un antígeno libre, Antic libre representa la concentración de un anticuerpo libre, y Ag-Ab representa la concentración de un complejo de antígeno-anticuerpo. Si Ag-Ab = x, la concentración de anticuerpo libre se representa con la siguiente expresión.

$$\text{Antic libre} = \text{Antic total} - x \dots (3)$$

Por lo tanto, la expresión (2) mencionada anteriormente puede ser

$$Kd = \text{Antíg libre} \times (\text{Antic total} - x) / x \dots (4)$$

Si ambos términos de la expresión (4) se multiplican por x / Kd x Antic total,

$$x / \text{Antic total} = \text{Antíg libre} \times (1 - x/\text{Antic total}) \times 1/Kd$$

$$x/\text{Antic total} \times 1/\text{Antíg libre} = (1 - x/\text{Antic total}) \times 1/Kd \dots (5)$$

Si X = x/Antic total e Y = x/Antic total x Antíg libre en la expresión (5),

$$Y = (1-X) \times 1/Kd \dots (6)$$

Basándose en la expresión (6), el valor de Kd se calculó.

Los valores de Kd de los 300 clones de anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 generados se midieron con el método descrito anteriormente. Como resultado, había 133 clones que presentaban un valor de Kd de 1 x 10<sup>-10</sup> (M) o inferior, 59 clones que presentaban un valor de Kd de 1 x 10<sup>-11</sup> (M) o inferior, y 2 clones que presentaban un valor de Kd de 1 x 10<sup>-12</sup> (M) o inferior.

Entre los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2, que presentaban actividad inhibitoria del crecimiento tumoral *in vivo*, se encontró que los valores de Kd de 5-70 (IgG2a de ratón), T6-16 (IgG2a de ratón), K5-107 (IgG1 de ratón) K5-116-2-1 (IgG1 de ratón) y T5-86 (IgG1 de ratón) eran 6,8 x 10<sup>-12</sup> (M), 4,3 x 10<sup>-12</sup> (M), 4,7 x 10<sup>-12</sup> (M), 2,69 x 10<sup>-11</sup>

(M) y  $8,49 \times 10^{-11}$  (M), respectivamente (Figura 1 y Tabla 1).

Tabla 1

| Valores de Kd de anticuerpos monoclonales anti-hTROP -2 |       |       |        |            |       |
|---|-------|-------|--------|------------|-------|
| Clon N.º  | K5-70 | T6-16 | K5-107 | K5-116-2-1 | T5-86 |
| Kd ( $\times 10^{-12}$ M)                               | 6,8   | 4,3   | 4,7    | 26,9       | 84,9  |

### 5 [Ejemplo 11]

[Reactividad de anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 con líneas de células de cáncer humano]

10 Las líneas de células de cáncer humano (líneas de células tumorales humanas) usadas en estos estudios se adquirieron en Health Science Research Resources Bank (HSRRB), banco de células RIKEN (RIKEN), ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo), ECACC (Colección Europea de Cultivos Celulares) y DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares). De forma específica, se usaron las siguientes líneas de células cancerosas.

15 huH-1 (HSRRB), HUH-6 (HSRRB), HuH-7 (HSRRB), JHH-5 (HSRRB), JHH-6 (HSRRB), JHH-7 (HSRRB), HLE (HSRRB), HLF (HSRRB), HepG2 (HSRRB), Alexander (HSRRB), KP-1N (HSRRB), KP-1NL (HSRRB), KP-2 (HSRRB), KP-3 (HSRRB), KP-3L (HSRRB), PK-1 (RIKEN), PANC-1 (RIKEN), MIA PaCa-2 (HSRRB), PK-59 (RIKEN), PK-45H (RIKEN), PK-45P (RIKEN), BxPC-3 (ATCC), SUIT-2 (HSRRB), TCC-PAN2 (HSRRB), SW480 (ATCC), DLD-1 (HSRRB), LoVo (HSRRB), COLO-320 (RIKEN), CACO-2 (RIKEN), CW-2 (RIKEN), HCT 116 (ATCC),  
20 HCC-56 (HSRRB), MCF-7 (HSRRB), JIMT-1 (DSMZ), HCC1143 (ATCC), A549 (HSRRB), DU145 (RIKEN) y PC-3 (HSRRB).

25 Las células cancerosas se retiraron de una placa de cultivo mediante un tratamiento con tripsina, y a continuación se preparó una suspensión celular (densidad celular:  $2 \times 10^6$  células/ml). Un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (0,1  $\mu$ g) se añadió a 100  $\mu$ l de la suspensión celular, y a continuación se hicieron reaccionar a 4 °C durante 20 minutos. La solución de reacción se lavó con PBS, y a continuación se hizo reaccionar con IgG anti-ratón etiquetado con PE (BD Biosciences Pharmingen) (0,1  $\mu$ g) (a 4 °C durante 30 minutos). A partir de ese momento, el producto resultante se analizó por FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

30 Todos los anticuerpos anti-hTROP-2 generados no se unían a una línea HuH-7 de células de cáncer de hígado humano, que no expresaban hTROP-2 de forma endógena. Por otro lado, los anticuerpos anti-hTROP-2 se unían a células HuH-7-hTROP-2, en las que un gen hTROP-2 se expresaba de forma estable (Figura 2). Posteriormente, la reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 generados con líneas de células de cáncer humano (en las que una proteína hTROP-2 se expresaba de forma endógena en la superficie celular) se examinó mediante  
35 análisis de FACS. Como resultado, los 300 tipos de anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 generados se unían a líneas de células de cáncer pancreático humano (PK-59 y BxPC-3). En particular, todos los anticuerpos K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 y T5-86, que presentaban actividad inhibitoria del crecimiento tumoral *in vivo*, se unían a líneas de células de cáncer humano a niveles elevados. Por ejemplo, cuando se comparaba con un caso en el que las líneas de células cancerosas reaccionaban solamente con IgG anti-ratón etiquetado con PE (BD Biosciences Pharmingen), los anticuerpos mencionados anteriormente presentaban la siguiente capacidad de unión a células PK-  
40 59 y a células BxPC-3 a una intensidad de fluorescencia media: K5-70 (44 veces), T6-16 (59 veces), K5-107 (89 veces), K5-116-2-1 (122 veces) and T5-86 (15 veces) (a células PK-59; Figura 3); y K5-70 (45 veces), T6-16 (25 veces), K5-107 (90 veces), K5-116-2-1 (121 veces) y T5-86 (10 veces) (a células BxPC-3; Figura 4).

45 Con respecto a líneas de células de cáncer humano distintas a PK-59 y BxPC-3, entre 12 tipos de líneas de células de cáncer pancreático, los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 se unían a KP-2, KP-3L, PK-1, PK-45H, SUIT-2 y TCC-PAN2, y no se unían a KP-1N, KP-1NL, KP-3, PANC-1 y MIA-PaCa2 (Figura 5). Entre las líneas de células de cáncer de colon humano, los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 se unían a CACO-2, SW480, DLD-1 y HCT 116, y no se unían a COLO-320 y CW-2 (Figura 6). Además, los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 se unían a  
50 JIMT-1 y HCC1143 (que eran ambas líneas de células de cáncer de mama humano) y a PC-3 y DU145 (que eran ambas líneas de células de cáncer de próstata humano). Por lo tanto, reconocían proteínas hTROP-2 que se expresaban de forma endógena en la superficie celular de muchos tipos de líneas de células de cáncer humano (Figura 6).

### 55 [Ejemplo 12]

[Reactividad cruzada con proteína TROP-2 de ratón y proteína TROP-1/EpCAM humana]

60 Con el fin de examinar la especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 generados, la reactividad de los anticuerpos con una proteína TROP-2 de ratón que muestra una homología de un 80 % al nivel de la secuencia de aminoácidos con la proteína hTROP-2, y con una proteína TROP-1/EpCAM humana que muestra una homología

de un 50 % al nivel de la secuencia de aminoácidos con la proteína hTROP-2, se examina mediante análisis de FACS.

5 De forma específica, cada uno de un vector de expresión (TROP-2-pcDNA3.1 de ratón (+), proporcionado por el Instituto de Biociencias Moleculares y Celulares, Universidad de Tokio) que comprendía un ADNc de longitud completa de un gen TROP-2 de ratón (N.º de registro en GenBank NM\_020047, Y08830), y un vector de expresión (pcDNA3.1-hEpCAM-myc/His) que comprendía el ADNc de longitud completa de un gen TROP-1/EpCAM humano (N.º de registro en GenBank NM\_002354), se introdujo de forma transitoria en células CHO-K1, usando el reactivo Lipofectamina 2000 reagent (Invitrogen). A partir de ese momento, de 24 a 48 horas más tarde, las células se retiraron de una placa de cultivo tratándolas con tripsina, y a continuación se preparó una suspensión celular. La suspensión celular preparada de este modo se hizo reaccionar de forma sucesiva con el anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (0,1 µg) producido y con IgG anti-ratón etiquetado con PE, y a continuación se analizó con FACSCalibur.

15 Un anticuerpo T2-102 (IgG1 de ratón) usado como un control positivo, que presentaba reactividad cruzada con TROP-2 de ratón, presenta una capacidad de unión elevada a las células CHO-K1 en las que el gen TROP-2 de ratón se expresaba de forma transitoria. Por otro lado, los anticuerpos K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 y T5-86 no presentaban una reactividad cruzada de este tipo con TROP-2 de ratón (Figura 7).

20 De forma análoga, un anticuerpo monoclonal EpCAM anti-humano (BD Biosciences Pharmingen) usado como un control positivo presentaba una capacidad de unión elevada a las células CHO-K1 en las que el EpCAM/TROP-1 humano se expresaba de forma transitoria. Por otro lado, los anticuerpos K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 y T5-86 no presentaban una reactividad cruzada de este tipo con EpCAM/TROP-1 humano (Figura 8).

25 Los resultados mencionados anteriormente demostraban que los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 generados, y en particular, los anticuerpos K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 y T5-86, que presentaban actividad antitumoral *in vivo*, se unían de forma específica a hTROP-2.

### [Ejemplo 13]

30 [Medición de la actividad inhibitoria del crecimiento celular]

Como un método para examinar la actividad del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 para inhibir la función de hTROP-2, la influencia del anticuerpo en el recinto celular de células cancerosas humanas, que expresan hTROP-2 de forma endógena en la superficie celular, se evaluó midiendo el número de células vivas usando TetraColor ONE (Seikagaku Corporation). De forma específica, las células PK-59 se suspendieron en un medio RPMI1640 que contenía suero bovino fetal al 0,5 % (preparado por BioWest) a una concentración celular de  $2 \times 10^5$  células/ml, y a continuación se añadieron 100 µl de la suspensión celular preparada a cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos. Posteriormente, la IgG de ratón (control negativo) y anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 (concentraciones finales: 0,1 y 1 µg/ml) se añadieron a los pocillos, y a continuación las mezclas se cultivaron a 37 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 72 horas. Como control, se usó un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (clon YY01, Santa Cruz) disponible en el mercado. Se añadió TetraColor ONE (Seikagaku Corporation) a los pocillos, y a continuación se hicieron reaccionar en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 % de 1 a 2 horas. Después de finalizar la reacción, la placa de cultivo de 96 pocillos se sometió directamente a la medición de absorbancia a una longitud de onda de 490 nm (longitud de onda de control: 655 nm), usando un Lector de Microplacas. El experimento se realizó usando 3 pocillos para cada grupo. Un ensayo de diferencia significativa se realizó de acuerdo con el ensayo t de Student, y se determinó que  $P < 0,05$  era estadísticamente significativo.

50 Entre los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2, que hasta el momento se habían generado en la propia compañía de los inventores, se examinaron aproximadamente 160 clones con el método descrito anteriormente, en términos de su efecto sobre el crecimiento celular de células PK-59. Como resultado, se confirmó que T6-16, T5-86, K5-70 y K5-107, que habían presentado actividad inhibitoria del crecimiento tumoral *in vivo*, tenían actividad inhibitoria del crecimiento celular de un 20 % a un 40 %, no se comparan con IgG de ratón (control negativo). Llegó a ser evidente que estos anticuerpos anti-hTROP-2 tienen actividad para unirse a proteínas hTROP-2, que se expresaban en la superficie de células cancerosas humanas, para neutralizar las proteínas hTROP-2, y para inhibir el crecimiento de las células cancerosas (Figura 9).

### [Ejemplo 14]

60 [Ensayo de raspado]

El efecto de un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 en la capacidad migratoria de células cancerosas humanas se evaluó mediante un ensayo de raspado. Las células PK-59 se suspendieron en un medio RPMI1640 que contenía suero bovino fetal al 10 % a una concentración de  $3 \times 10^5$  células/ml, y a continuación 100 µl de la suspensión celular preparada se añadieron a cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos. Cuando las células llegaron a ser confluentes, una porción de las células cultivadas en monocapa se desprendió, de modo que la placa se raspó en una dirección longitudinal con el extremo de una punta. Un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 e IgG de ratón

usada como un control negativo se añadieron al medio hasta concentraciones finales de 0,1 y 1 µg/ml, respectivamente, y a continuación el cultivo se llevó a cabo durante 24 horas. Antes de añadir el anticuerpo (Día 0) y 24 horas después del cultivo (Día 1), la región desprendida de la célula se fotografió, y a continuación se midió la distancia entre las células. Además, el área de una región desprendida de este tipo se cuantificó usando el software Scion Image. El experimento se realizó usando 8 pocillos para cada grupo. Un ensayo de diferencia significativa se realizó de acuerdo con el ensayo t de Student, y se determinó que  $P < 0,05$  era estadísticamente significativo.

El efecto de un anticuerpo hTROP-2 en la capacidad migratoria de las células que invaden la región de raspado se examinó. Al igual que con el ensayo de inhibición del crecimiento celular, se evaluaron anticuerpos que tenían efectos beneficiosos. Como un método de evaluación, las células se fotografiaron el Día 0 (cuando se añadía el anticuerpo) y el Día 1 (24 horas después de añadir el anticuerpo), y la distancia migratoria (µm) y el área de una región de raspado se determinaron mediante análisis de imágenes. Como resultado, como se muestra en la Figura 10, se observaron diferencias evidentes en términos de la capacidad migratoria de las células. Los anticuerpos T6-16 y K5-70, que se usaron en el presente ensayo, presentaban una actividad inhibitoria del crecimiento celular significativa, cuando se comparaban con el control. Incluso en un ensayo de reproducibilidad, se observaba la misma tendencia. En particular, T6-16 presentaba un resultado de  $P < 0,01$  (mediante ensayo t de Student), y se encontró correlación con el ensayo *in vivo*.

### [Ejemplo 15]

[Evaluación de efectos beneficiosos del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 en ratones portadores de tumor]

Modelo de prevención

Las líneas de células de cáncer pancreático (PK-59 y BxPC-3), que expresaban hTROP-2, se retiraron tratando las células con tripsina, y PBS se añadió a las mismas para preparar una suspensión celular que tenía una concentración de  $1 \times 10^8$  células/ml. La suspensión celular preparada de este modo se mezcló con una cantidad igual de Matrigel (BD Biosciences Pharmingen) en hielo. Usando una jeringa de calibre 26 G, se inyectaron 100 µl de la mezcla obtenida ( $5 \times 10^6$  células) en la hipodermis del costado derecho de cada ratón atímico hembra de 6 semanas de edad (Balb/c, nu/nu). El día del trasplante de las células cancerosas (Día 1), los ratones se dividieron en grupos, y comenzó la administración del anticuerpo (1, 5 o 10 mg/kg de peso corporal, administración intraperitoneal). A partir de ese momento, la administración del anticuerpo continuó a intervalos de una vez cada tres días. La actividad anti tumoral se evaluó basándose en la frecuencia de formación de tumor y el volumen tumoral. El volumen tumoral se calculó con la siguiente fórmula.

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = (\text{eje secundario})^2 \times (\text{eje principal}) \times \pi/6$$

Modelo de tratamiento

Las líneas de células de cáncer pancreático (PK-59 y BxPC-3), que expresaban hTROP-2, se retiraron tratando las células con tripsina, y PBS se añadió a las mismas para preparar una suspensión celular que tenía una concentración de  $1 \times 10^8$  células/ml. La suspensión celular preparada de este modo se mezcló con una cantidad igual de Matrigel (BD Biosciences Pharmingen) en hielo. Usando una jeringa de calibre 26 G, se inyectaron 100 µl de la mezcla obtenida (Balb/c, nu/nu). De cinco a seis días después del trasplante de las células cancerosas, los ratones cuyo volumen tumoral había aumentado de 50 a 150 mm<sup>3</sup> (valor medio: aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>) se dividieron en grupos. El día en el que los ratones se dividieron en grupos se definió como un primer día (Día 1), y comenzó la administración del anticuerpo. El anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a intervalos de una vez cada tres días (10 mg/kg de peso corporal). La actividad tumoral se evaluó midiendo el volumen tumoral. Un ensayo de diferencia significativa se realizó de acuerdo con el ensayo t de Student, y se determinó que  $P < 0,05$  era estadísticamente significativo.

### [Ejemplo 16]

[Análisis de actividad antitumoral *in vivo* del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 en modelo de xenoinjerto de células de cáncer pancreático humano]

Es esencial que un anticuerpo usado para el tratamiento de cáncer, que tiene como diana a hTROP-2, tenga la actividad de eliminar de forma específica tejidos tumorales que expresan hTROP-2 o que inhiben el crecimiento del tumor.

Los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 (aproximadamente 160 clones), recién producidos en la presente invención, se evaluaron usando los modelos de tratamiento de xenoinjerto de una línea PK-59 de células de cáncer pancreático. Las células PK-59 expresan, en la superficie de las mismas, EpCAM (Figura 11A) que actúa como un marcador de células madre de cáncer pancreático (Chenwei Li, *et al.* Cancer Res 2007; 67: (3). 1030-1037), y que

también expresan P-glicoproteína/MDR1 (Figura 11B) y ABCG2/CDw338 (Figura 11C) (Chen, C. J. *et al.* Cell 47 (3), 381-389 (1986), Allikmets, R., *et al.* Hum. Mol. Genet. 5 (10), 1649-1655 (1996)), que son transportadores de ABC asociados a resistencia a fármacos. Además, las células PK-59 contienen una fracción celular (8,93 %) (Figura 11D) positiva tanto para CD24 como para CD44, que es característico para las células madre de cáncer pancreático, y se supone que son una línea de células de cáncer pancreático humano altamente maligna (Chenwei Li, *et al.* Cancer Res 2007; 67: (3). 1030-1037, Jane E. Visvader y Geoffrey J. Lindeman. Nat Rev Cancer. Vol. 8 (10): 755-68, 2008).

La mayoría de los aproximadamente 160 clones recién generados no presentaban efectos beneficiosos en los modelos de tratamiento de xenoinjerto de células PK-59. Entre los clones de este tipo, se pudieron obtener clones que presentan una actividad inhibitoria del crecimiento tumoral, significativa, en particular los clones K5-70, T6-16, K5-107, T5-86 y K5-116-2-1.

En un grupo de administración del clon K5-70 (IgG2a de ratón), la tasa de crecimiento tumoral se inhibe de forma estadísticamente significativa. El 21<sup>er</sup> día después del inicio de la administración (día 21), el volumen tumoral de un grupo de control (N = 14) era  $1200,8 \pm 377,3 \text{ mm}^3$ , mientras que el volumen tumoral del grupo de administración del clon K5-70 era  $748,7 \pm 162,9 \text{ mm}^3$  ( $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student) (Figura 12A). Cuando el volumen tumoral en el momento del inicio de la administración del anticuerpo se definía como 1,0, el volumen tumoral en el 21<sup>er</sup> día (Día 21) era 7,8 en el grupo de administración del clon K5-70, mientras que el volumen tumoral del grupo de control era 12,5 (Figura 12A). El peso del tumor extirpado era  $0,43 \pm 0,14 \text{ g}$  ( $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student) en el grupo de administración del clon K5-70, mientras que el del grupo de control era  $0,73 \pm 0,26 \text{ g}$ . Por lo tanto, el clon K5-70 presentaba una actividad inhibitoria de aproximadamente un 60 % (Figura 12B).

De forma análoga, la tasa de crecimiento tumoral se inhibía de forma significativa incluso en un grupo (N = 8) de administración del clon K5-107 (IgG1 de ratón), un grupo (N = 8) de administración del clon T6-16 (IgG2a de ratón), un grupo de administración del clon T5-86 (IgG1 de ratón) y un grupo (N = 8) de administración del clon K5-116-2-1 (IgG2a de ratón). En el 17<sup>o</sup> día después del inicio de la administración (Día 17), los volúmenes tumorales del grupo (N = 8) de administración del clon K5-107 y el grupo (N = 8) de administración del clon T6-16 eran  $698,2 \pm 175,9 \text{ mm}^3$  ( $P < 0,05$  mediante ensayo t de Student) y  $707,2 \pm 254,5 \text{ mm}^3$  ( $P < 0,05$  mediante ensayo t de Student), respectivamente, mientras que el volumen tumoral del grupo de control era  $1039,3 \pm 271,6 \text{ mm}^3$ . De forma análoga, en el 16<sup>o</sup> día después del inicio de la administración (Día 16), el volumen tumoral del grupo (N = 8) de administración del clon K5-116-2-1 era  $508,5 \pm 225,2 \text{ mm}^3$  ( $P < 0,05$  mediante ensayo t de Student), mientras que el volumen tumoral del grupo de control (N = 8) era  $797,0 \pm 172,9 \text{ mm}^3$  (Figura 13).

Por otro lado, en el caso del clon T5-86, en el 15<sup>o</sup> día después del inicio de la administración (Día 15), el tumor del grupo (N = 8) de administración del clon T5-86 era  $744,1 \pm 289,1 \text{ mm}^3$ , mientras que el volumen tumoral del grupo de control (N = 8) era  $1033,2 \pm 319,4 \text{ mm}^3$ . Por lo tanto, no se encontró diferencia significativa en términos de volumen tumoral. Sin embargo, en la comparación del peso del tumor, que se realizó el mismo día, el peso del tumor del grupo de administración del clon T5-86 era  $0,44 \pm 0,13 \text{ g}$  ( $P < 0,05$  mediante ensayo t de Student), mientras que el peso del tumor del grupo de control era  $0,62 \pm 0,14 \text{ g}$ . Por lo tanto, el clon T5-86 presentaba una actividad inhibitoria significativa.

Además, en términos tanto de volumen tumoral como de peso del tumor, la proporción (T/C) de cada grupo de administración del clon con respecto al grupo de control el día final del experimento se muestra en la Tabla 2 que sigue a continuación. Como se muestra en la Tabla 2, cada anticuerpo del clon presentaba una actividad inhibitoria significativa (T/C = 62 % a un 72 %) en cada grupo de administración de anticuerpo del clon.

Tabla 2

| Grupo      | N (número de ratones) | T/C de volumen tumoral (%) | T/C de peso tumoral (%) |
|------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------|
| K5-70      | 14                    | 62,3**                     | 58,8**                  |
| K5-107     | 8                     | 67,2*                      | 65,0*                   |
| T6-16      | 8                     | 68,0*                      | 64,7*                   |
| T5-86      | 8                     | 72,0                       | 70,5*                   |
| K5-116-2-1 | 8                     | 63,8*                      | 60,5*                   |

\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  (mediante ensayo t de Student)

Además, se analizó la actividad antitumoral de cada uno de los clones K5-70, T6-16 y K5-116-2-1 en los modelos de prevención de xenoinjerto de la línea PK-59 de células de cáncer pancreático. Después de finalizar la administración de cada clon de anticuerpo, el crecimiento tumoral se inhibió en todos los individuos (N = 8). En el 18<sup>o</sup> día después del inicio de la administración (Día 18), el volumen tumoral del grupo de administración del clon K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) era  $62,4 \pm 80,4 \text{ mm}^3$  ( $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student), mientras que el volumen tumoral del grupo de control (N = 8) era  $880,8 \pm 206,4 \text{ mm}^3$ . Por lo tanto, el clon K5-70 presentaba una actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de un 92,9 %. En el 28<sup>o</sup> día después del inicio de la administración (Día 28), el volumen tumoral

del grupo de administración del clon T6-16 (10 mg/kg de peso corporal) era  $152,4 \pm 122,3 \text{ mm}^3$  ( $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student), mientras que el volumen tumoral del grupo de control (N = 8) era  $992,3 \pm 250,8 \text{ mm}^3$ . Por lo tanto, el clon T6-16 presentaba una actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de un 84,6 %. En el 20º día después del inicio de la administración (Día 20), el volumen tumoral del grupo de administración del clon K5-116-2-1 (10 mg/kg de peso corporal) era  $207,7 \pm 319,2 \text{ mm}^3$  ( $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student), mientras que el volumen tumoral del grupo de control (N = 8) era  $1159,4 \pm 413,3 \text{ mm}^3$ . Por lo tanto, el clon K5-116-2-1 presentaba una actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de un 82,1 % (Figura 14 y Tabla 3). Además, en todos los experimentos, no había diferencia significativa entre el grupo de control y cada grupo de administración de anticuerpo anti-hTROP-2 en términos de un cambio en el peso corporal promedio durante todo el periodo de ensayo.

En términos tanto de volumen tumoral como de peso del tumor, la proporción (T/C) de cada grupo de administración del clon con respecto al grupo de control el día final del experimento se muestra en la Tabla 3 que sigue a continuación. Como se muestra en la Tabla 3, una inhibición del crecimiento tumoral significativa se observaba en cada grupo de administración de anticuerpos del clon, y en particular, un efecto significativo tal como T/C = 10 % o inferior se confirmó en el grupo de administración del clon K5-70.

Tabla 3

| Grupo      | N (número de ratones) | T/C de volumen tumoral (%) | T/C de peso tumoral (%) |
|------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------|
| K5-70      | 8                     | 7,1**                      | 5,8**                   |
| T6-16      | 8                     | 15,3**                     | 10,5**                  |
| K5-116-2-1 | 8                     | 23,2**                     | 21,5**                  |

\*\* P < 0,01 (mediante ensayo t de Student)

El anticuerpo AR47A6.4.2 anti-TROP-2 conocido (documento de Patente de Estados Unidos N.º 7420041) ha presentado el efecto de inhibición del crecimiento tumoral, a una dosificación de 20 mg/kg, en modelos de prevención de xenoinjerto usando diversas líneas de células de cáncer humano. Este anticuerpo AR47A6.4.2 anti-TROP-2 ha inhibido el crecimiento tumoral de una línea de células PL45 de cáncer pancreático en un porcentaje de casi un 100 %. Sin embargo, este anticuerpo ha presentado el efecto de inhibición tumoral en una línea de células BxPC-3 de cáncer pancreático en un porcentaje de aproximadamente un 50 %, en una línea de células PC-3 de cáncer de próstata en un porcentaje de aproximadamente un 40 %, en una línea de células MCF-7 de cáncer de mama en un porcentaje de aproximadamente un 60 %, y en una línea de células Colo205 de cáncer de colon en un porcentaje de aproximadamente un 40 %. Por el contrario, el anticuerpo anti-hTROP-2 de la invención de la presente solicitud ha presentado un efecto inhibitorio del crecimiento tumoral más elevado a una dosificación de la mitad de la dosis mencionada anteriormente (10 mg/kg).

### [Ejemplo 17]

[Análisis de actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto (modelos de prevención y modelos de tratamiento) de la línea de células BxPC-3 de cáncer pancreático humano]

Al igual que en el caso del uso de los modelos de tratamiento de xenoinjerto descritos anteriormente de la línea de células de cáncer pancreático humano PK-59, se analizó la actividad antitumoral del clon K5-70 en modelos de prevención de xenoinjerto modelos de tratamiento de xenoinjerto de una línea de células BxPC-3 de cáncer pancreático humano.

Cuando se comparaba con un grupo de control (N = 8), el crecimiento tumoral del grupo de administración del clon K-70 se inhibía de forma significativa. En el 52º día (Día 52), el volumen tumoral del grupo de administración del clon K5-70 (N = 8) era  $236,0 \pm 136,4 \text{ mm}^3$ , mientras que el volumen tumoral del grupo de control (N = 8) era  $616,3 \pm 266,8 \text{ mm}^3$ . Por lo tanto, el clon K-70 presentaba un efecto inhibitorio del crecimiento tumoral de un 61,7 % ( $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student) (Figura 15).

A partir de los resultados mencionados anteriormente, llegó a ser evidente que el anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 presenta una actividad inhibitoria del crecimiento tumoral *in vivo* significativa en al menos dos especies de células de cáncer.

### [Ejemplo 18]

[Actividad antitumoral dependiente de la dosis del anticuerpo anti-hTROP-2 (clon K5-70) en modelos de prevención de xenoinjerto de línea de células de cáncer pancreático que expresan hTROP-2 (células PK-59)]

Con el fin de analizar con más detalle la actividad inhibitoria del crecimiento tumoral *in vivo* del anticuerpo anti-hTROP-2, se realizó un ensayo dependiente de la dosis. Como se muestra en la Figura 16, el crecimiento tumoral de las células PK-59 se inhibía de forma dependiente de la dosis con la administración de K5-70. En el 21º día después

de la administración del anticuerpo (Día 21), el volumen tumoral del grupo de control (N = 7) era  $937,8 \pm 295,3 \text{ mm}^3$ . Por otro lado, el volumen tumoral del grupo (N = 8) de administración de K5-70 (1 mg/kg) era  $493,5 \pm 305,1 \text{ mm}^3$ , lo que muestra una tasa inhibitoria de un 50 %, y el volumen tumoral del grupo (N = 8) de administración de K5-70 (5 mg/kg) era  $124,7 \pm 89,0 \text{ mm}^3$ , lo que muestra una tasa inhibitoria de un 90 %. Por lo tanto, llegó a ser evidente que, cuando se compara con el anticuerpo AR47A6.4.2 anti-TROP-2 (documento de Patente de Estados Unidos N.º 7420041), el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención presenta *in vivo* un efecto inhibitorio del crecimiento tumoral equivalente al del anticuerpo AR47A6.4.2 anti-TROP-2 a una dosificación de un-veinteavo del anticuerpo AR47A6.4.2 anti-TROP-2, y que presenta un efecto inhibitorio más elevado de un 90 % a una dosificación de un-cuarto del mismo.

### [Ejemplo 19]

[Ensayo de epítipo]

#### Preparación de proteína TROP-2 quimérica de ser humano/ratón

Un gen TROP-2 de ser humano/ratón se preparó de acuerdo con un método de PCR. Los cebadores de PCR, como se muestra a continuación, se diseñaron basándose en una secuencia genética de TROP-2 de ser humano y en una secuencia genética de TROP-2 de ratón (N.º de registro en Genbank NM\_020047).

Cebadores TROP-2-C de ser humano/ratón

Y606 (lado directo): 5'-cctgagcctacgctgacgaagtggcg-3' (SEQ ID NO: 10)

Y607 (lado inverso): 5'-cgcaccactctgctgcagcgtaggctcagg-3' (SEQ ID NO: 11)

Cebadores TROP-2-A de ser humano/ratón

Y612 (lado directo): 5'-gactgctccacgctgactccaagtgcctg-3' (SEQ ID NO: 12)

Y613 (lado inverso): 5'-caggcacttggagtcagcgtggagcagtc-3' SEQ ID NO: 13)

Cebadores TROP-2-B de ser humano/ratón

Y614 (lado directo): 5'-ctcgtggacaacgatggcctctacgacccg-3' (SEQ ID NO: 14)

Y615 (lado inverso): 5'-cgggtcgtagaggccatcgttccacgag-3' (SEQ ID NO: 15)

Cebadores TROP-2-D de ser humano/ratón

Y608 (lado directo): 5'-ccaaagcctgcgctgcatgagctggcg-3' (SEQ ID NO: 16)

Y609 (lado inverso): 5'-gcgaccagctcatcgcagcgcaggcttgg-3' (SEQ ID NO: 17)

Cebadores TROP-2-E de ser humano/ratón

Y616 (lado directo): 5'-agcttctatccgctgactacgagcag-3' (SEQ ID NO: 18)

Y617 (lado inverso): 5'-ctgctctagtcaccgcgataggaagct-3' (SEQ ID NO: 19)

Cebadores TROP-2-F de ser humano/ratón

Y618 (lado directo): 5'-gacattaaaggcagctctattccagggc-3' (SEQ ID NO: 20)

Y619 (lado inverso): 5'-gccctggaatagagactcgctttaatgct-3' (SEQ ID NO: 21)

Cebadores TROP-2 de ratón

Cebador directo: 5-ctactccacccaccctggcg-3' (SEQ ID NO: 22)

Cebador inverso: 5'-ctcgagcaagctaggttcgcttctc-3' (SEQ ID NO: 23)

Al cebador inverso TROP-2 de ratón, se añadió una secuencia digerida con enzima de restricción *XhoI* excepto para un codón de finalización. En la Figura 17A se muestra una vista esquemática de proteínas TROP-2 quiméricas de ser humano/ratón preparadas.

La proteína quimérica hmTROP-2-A es una proteína quimérica, que consiste en un polipéptido que varía desde el extremo en la posición N-terminal con respecto al aminoácido en la posición 69 de la proteína hTROP-2 y un polipéptido que varía desde el aminoácido en la posición 64 con respecto al extremo C-terminal de la proteína TROP-2 de ratón. La proteína quimérica hmTROP-2-B es una proteína quimérica, que consiste en un polipéptido que varía desde el extremo en la posición N-terminal con respecto al aminoácido en la posición 101 de la proteína hTROP-2 y un polipéptido que varía desde el aminoácido en la posición 96 con respecto al extremo C-terminal de la proteína TROP-2 de ratón. La proteína quimérica hmTROP-2-C es una proteína quimérica, que consiste en un

polipéptido que varía desde el extremo en la posición N-terminal con respecto al aminoácido en la posición 145 de la proteína hTROP-2 y un polipéptido que varía desde el aminoácido en la posición 140 con respecto al extremo C-terminal de la proteína TROP-2 de ratón. La proteína quimérica mhTROP-2-D es una proteína quimérica, que consiste en un polipéptido que varía desde el extremo en la posición N-terminal con respecto al aminoácido en la posición 139 de la proteína TROP-2 de ratón y un polipéptido que varía desde el aminoácido en la posición 146 con respecto al extremo C-terminal de la proteína TROP-2. La proteína quimérica mhTROP-2-E es una proteína quimérica, que consiste en un polipéptido que varía desde el extremo en la posición N-terminal con respecto al aminoácido en la posición 187 de la proteína TROP-2 de ratón y un polipéptido que varía desde el aminoácido en la posición 194 con respecto al extremo C-terminal de la proteína TROP-2. La proteína quimérica mhTROP-2-F es una proteína quimérica, que consiste en un polipéptido que varía desde el extremo en la posición N-terminal con respecto al aminoácido en la posición 227 de la proteína TROP-2 de ratón y un polipéptido que varía desde el aminoácido en la posición 234 con respecto al extremo C-terminal de la proteína TROP-2.

Los vectores de expresión usados en la preparación de las proteínas quiméricas descritas anteriormente se construyeron de forma específica con los siguientes métodos. Para preparar un gen quimérico hmTROP-2-A, el gen hTROP-2 se usó como un molde, y se realizó PCR usando el cebador directo hTROP-2 y el cebador Y613 TROP-2-A de ser humano/ratón. De forma análoga, el gen TROP-2 de ratón se usó como un molde, y se realizó PCR usando el cebador Y612 TROP-2-A de ser humano/ratón y el cebador inverso TROP-2 de ratón. Un fragmento de ADN amplificado con la PCR se desarrolló usando gel de acrilamida, y a continuación se recuperó una banda de interés mediante extracción. Posteriormente, los dos tipos de fragmentos de ADN extraídos se mezclaron para preparar un molde, y a continuación la PCR se llevó a cabo usando el cebador directo hTROP-2 y el cebador inverso TROP-2 de ratón. Un producto de PCR se desarrolló mediante electroforesis en gel de agarosa, y a continuación se extrajo un fragmento de ADN de interés. El fragmento de ADN extraído se clonó en un vector Blunt para pCR (marca comercial registrada) (Invitrogen) (pCRB-hmTROP-2-A), y a continuación se confirmó una secuencia genética. Un vector de expresión para células animales se produjo retirando el gen hTROP-2 de pcDNA3.1-hTROP-2-*myc*/His mediante digestión con *EcoRI/XhoI*, y a continuación insertando en el mismo un fragmento de *EcoRI/XhoI* que contenía un gen quimérico hmTROP-2-A preparado a partir de pCRB-hmTROP-2-A (pcDNA3.1-hmTROP-2-A-*myc*/His). Además, los siguientes genes quiméricos se prepararon con el mismo método como se ha descrito anteriormente, y se construyeron vectores de expresión: hmTROP-2-B (usando un cebador directo de TROP-2 humano, un cebador Y615 de TROP-2-B de ser humano/ratón, un cebador Y614 de TROP-2-B de ser humano/ratón y un cebador inverso TROP-2 de ratón), hmTROP-2-C (usando un cebador directo de TROP-2 humano, un cebador Y607 de TROP-2-C de ser humano/ratón, un cebador Y606 de TROP-2-C de ser humano/ratón y un cebador inverso TROP-2 de ratón), mhTROP-2-D (usando un cebador inverso TROP-2 de ratón, un cebador Y609 de TROP-2-D de ser humano/ratón, un cebador Y608 de TROP-2-D de ser humano/ratón y un cebador inverso de TROP-2 humano), mhTROP-2-E (usando un cebador directo TROP-2 de ratón, un cebador Y617 de TROP-2-E de ratón/ser humano, un cebador Y616 de TROP-2-E de ratón/ser humano y un cebador inverso de TROP-2 humano), mhTROP-2-F (usando un cebador directo TROP-2 de ratón, un cebador Y619 de TROP-2-F de ratón/ser humano, un cebador Y618 de TROP-2-F de ratón/ser humano y un cebador inverso TROP-2 humano) (pcDNA3.1-hmTROP-2-B-*myc*/His, pcDNA3.1-hmTROP-2-C-*myc*/His, pcDNA3.1-mhTROP-2-D-*myc*/His, pcDNA3.1-mhTROP-2-E-*myc*/His, y pcDNA3.1-mhTROP-2-F-*myc*/His).

Establecimiento de líneas de células HEK293, que expresan, de manera constitutiva, hTROP-2, proteínas quiméricas TROP-2-C de ser humano/ratón y TROP-2-D de ratón/ser humano

Cada uno de los vectores de expresión, descritos anteriormente, pcDNA3.1-hTROP-2-*myc*/His, pcDNA3.1-hmTROP-2-C-*myc*/His and pcDNA3.1-mhTROP-2-D-*myc*/His, se introdujeron en células HEK293. La selección se realizó usando un antibiótico G418 (Calbiochem), y se establecieron líneas de células HEK293 que expresan de forma constitutiva la proteína hTROP-2, la proteína quimérica hmTROP-2-C y la proteína quimérica mhTROP-2-D.

Se identificaron las regiones de unión de los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 K5-70, T5-86, K5-107, T6-4, T6-16 y K5-116-2-1, que presentaban efectos beneficiosos en los modelos de tratamiento de xenoinjerto de la línea PK-59 de células de cáncer pancreático. En primer lugar, la reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 que presentaban efectos beneficiosos con células HEK293, que expresan constantemente las proteínas quiméricas hmTROP-2-C y mhTROP-2-D, se examinó mediante análisis de FACS (Figura 18). Como resultado, se encontró que K5-70, K5-107, T5-86 y K5-116-2-1 reaccionaban con hmTROP-2-C, pero que estos anticuerpos no reaccionaban con mhTROP-2-D. Por otro lado, T6-4 y T6-16 reaccionaban con mhTROP-2-D, pero no reaccionaban con hmTROP-2-C. A partir de estos resultados, la región de unión de cada uno de K5-70, K5-107, T5-84 y K5-116-2-1 se limitó a una región que variaba desde el extremo N-terminal con respecto al aminoácido en la posición 145 de hTROP-2, y la región de unión de cada uno de T6-4 y T6-16 se limitó a una región que variaba desde el aminoácido en la posición 146 con respecto al aminoácido en la posición 274 de hTROP-2 (Figura 18).

Para analizar las regiones de unión con más detalle, se prepararon vectores usados en la expresión de proteínas quiméricas hmTROP-2-A, hmTROP-2-B, mhTROP-2-E y mhTROP-2-F, y se analizó la reactividad de las proteínas quiméricas con los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 que presentaban efectos beneficiosos (Figura 19). Cada uno de los vectores de expresión recién preparados, que se iban a usar en la expresión de las proteínas quiméricas, se introdujo en células HEK293, y a continuación se llevó a cabo un análisis de FACS, usando las células que



expresaban de forma transitoria las proteínas quiméricas. K5-70, K5-107, T5-86 y K5-116-2-1 reaccionaban con hmTROP-2-A, pero no reaccionaban con mhTROP-2-B. Los 6 tipos examinados de anticuerpos monoclonales reaccionaban con hTROP-2. Estos resultados mostraban claramente que la región de unión de K5-70, K5-107, T5-86 y K5-116-2-1 está presente en una región que varía desde el extremo N-terminal con respecto al aminoácido en la posición 69 de hTROP-2. Además, no T6-4 y T6-16 reaccionaban con ninguno de mhTROP-2-E ni mhTROP-2-F. Esto sugería que estos anticuerpos reconocen una región que varía desde el aminoácido en la posición 146 con respecto al aminoácido en la posición 193 de hTROP-2.

**[Ejemplo 20]**

[Inmunohistoquímica]

<Materiales/Método>

En la inmunohistotinción se usaron las siguientes matrices de tejido normal y de cáncer.

Matrices de tejido normal humano:

Órganos normales, humanos por duplicado (N.º de Catálogo: AB1, Super Bio Chips)

Tejidos normales más que aplicaciones puntuales individuales (N.º de Catálogo: A103 (VI), ISU ABXIS)

Matrices de tejido de cáncer de pulmón:

Metástasis-normal de cáncer de pulmón humano (N.º de Catálogo: CCA3, Super Bio Chips)

Tejido de carcinoma de pulmón humano con tejido en el borde, 2 núcleos de ubicación (N.º de Catálogo: OD-CT-RsLug03-002, Shanghai Outdo Biotech)

Matriz de tejido de cáncer pancreático:

Tejido de carcinoma de páncreas humano con tipo monopatólogico en 60 casos, 2 núcleos de ubicación (N.º de Catálogo: OD-CT-DgPan03-001, Shanghai Outdo Biotech)

Matrices de tejido de cáncer de hígado:

Carcinoma hepatocelular, grados I a III con controles de tejido normal, 63 casos en matrices tisulares (N.º de Catálogo: CS03-01-002U, Cybrdi)

Tejido de carcinoma de hígado humano con tipo monopatólogico en 30 casos, 2 núcleos de ubicación (N.º de Catálogo: OD-CT-DgLiv02-002, Shanghai Outdo Biotech)

Matrices de tejido de cáncer de colon:

Cáncer colorrectal, humano (N.º de Catálogo: CD3, Super Bio Chips)

Carcinoma de colon humano con tejido en el borde, 2 núcleos de ubicación (N.º de Catálogo: OD-CT-DgCo103-002, Shanghai Outdo Biotech)

Matrices de tejido con metástasis de ganglios linfáticos de cáncer de colon y metástasis de hígado:

Cáncer colorrectal (colon y recto) con matriz de tejido de metástasis de ganglios linfáticos con emparejada, 44 casos/99 núcleos, portaobjetos de ensayo (N.º de Catálogo: CO991t, Biomax us)

Cáncer colorrectal (colon y recto) con matriz de tejido de adyacente de metástasis de ganglios linfáticos y normal emparejada, 43 casos/99 núcleos (N.º de Catálogo: CO992, Biomax us)

Metástasis en tejidos de cáncer de colon\_hígado (N.º de Catálogo: A203 (IV), ISU ABXIS)

Matrices de tejido de cáncer de mama:

Cáncer de mama, humano-metástasis-normal (N.º de Catálogo: CBA3, Super Bio Chips)

Carcinoma de mama humano con tejido en el borde, 2 núcleos de ubicación (N.º de Catálogo: OD-CT-RpBre03-002, Shanghai Outdo Biotech)

Matrices de tejido de cáncer de estómago:

Cáncer de estómago, humano (N.º de Catálogo: CQ1, Super Bio Chips)

Carcinoma gástrico humano con tejido en el borde, 2 núcleos de ubicación (N.º de Catálogo: OD-CT-DgStm03-002, Shanghai Outdo Biotech)

Matriz de tejido de cáncer de esófago:

Cáncer de esófago, humano (N.º de Catálogo: CR1, Super Bio Chips)  
 Carcinoma de esófago humano con tejido en el borde, 2 núcleos de ubicación (N.º de Catálogo: OD-CT-DgEso03-002, Shanghai Outdo Biotech)

5 Matriz de tejido de cáncer de ovario:

Cáncer de ovario, humano (N.º de Catálogo: CJ1, Super Bio Chips)

10 Matriz de tejido de cáncer de próstata:

Cáncer de próstata, humano-normal (N.º de Catálogo: CA3, Super Bio Chips)

Matriz de tejido de cáncer de vejiga:

15 Carcinoma de vejiga / carcinoma de células transicionales, grados I a III con matrices de tejido normal (N.º de Catálogo: CC12-01-001U, Cybrdi)

La información del paciente y la información clínica con respecto a los matrices de tejido descritas anteriormente se obtuvieron a partir de fichas de datos unidas a las mismas y en las páginas de inicio de compañías individuales.

20 Método de inmunohistotinción

Después de finalizar un tratamiento de desparafinación, los portaobjetos de matriz de tejido de tejidos normales y de tejidos de cáncer humanos se sometieron a un tratamiento de proteasa con pepsina a 37 °C durante 5 minutos. A partir de ese momento, las secciones se usaron en inmunotinción usando un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2. Una reacción de color se realizó usando DAB(3,3'-diaminobencidina) como sustrato, y como una contra tinción, a continuación se realizó tinción nuclear usando hematoxilina.

De forma más específica, estas operaciones se realizaron como sigue a continuación. Una sección embebida en parafina se sometió a un tratamiento de desparafinación, y a continuación se sometió a un tratamiento de proteasa con pepsina (DAKO) a 37 °C durante 5 minutos. Después de activar el antígeno, la sección se trató a temperatura ambiente durante 20 minutos usando una solución preparada añadiendo una solución de peróxido de hidrógeno a metanol hasta una concentración final de un 0,3 %, de modo que la actividad de peroxidasa endógena se eliminó. El producto resultante se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos dos veces, y a continuación se bloqueó a temperatura ambiente durante 30 minutos usando una solución de PBS que contenía suero de caballo normal al 1,5 % (DAKO), con el fin de realizar una operación para bloquear la unión no específica en los tejidos. Posteriormente, el producto resultante se hizo reaccionar con el clon del K5-63-17 anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (concentración final: 10 µg/ml), que se había diluido con una solución de PBS que contenía suero de caballo normal al 1,5 %, a temperatura ambiente durante 1 hora, y a continuación se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos tres veces. A partir de ese momento, un anticuerpo de IgG anti-ratón (Vector), que se había diluido 200 veces con una solución de PBS que contenía suero de caballo normal al 1,5 %, se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. El producto de reacción se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos tres veces, y con reactivo del kit Vectastain ABC (Vector) se mezcló de acuerdo con el manual de instrucciones incluido en el mismo, con el fin de preparar un complejo de ABC. Este complejo de ABC se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. El producto de reacción se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos tres veces, y a continuación se realizó un desarrollo de color usando una solución de DAB de Tinción Simple de Sustrato de Histofina Peroxidasa (Nichirei Biosciences). Después de finalizar el desarrollo de color, el producto de reacción se lavó con agua desionizada durante 5 minutos, y el núcleo se tiñó con una solución de hematoxilina de Mayer (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). A partir de ese momento, la deshidratación se realizó con alcohol, seguido de penetración con xileno y montaje en Entellan New (Merck Japón).

<Resultados>

55 Expresión de hTROP-2 en tejidos normales humanos

El patrón de expresión de hTROP-2 en tejidos normales humanos se analizó usando el clon K5-63-17 del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2. Una matriz de tejido normal humano (N.º de Catálogo: AB1, Super Bio Chips) se desparafinizó, y a continuación se sometió a tratamiento hidrófilo. A partir de ese momento, el antígeno se activó con una proteasa, pepsina, y a continuación la inmunotinción se realizó usando el clon K5-63-17 del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (Figura 20). Como resultado, se observó tinción en la piel, esófago, riñón (corteza y médula), páncreas, próstata, vejiga y amígdalas. Una mayoría de imágenes teñidas se localizaban en la membrana celular (Figura 20A, B, C, D, F, G y H), pero la expresión de hTROP-2 se observaba parcialmente incluso en el citoplasma (Figura 20E y H). Por otro lado, una tinción de este tipo no se observaba en el corazón, hígado, estómago, intestino delgado, intestino grueso, músculo esquelético, pulmón, bazo, glándula del timo y similares (Figura 20I y J).

Expresión de hTROP-2 en tejidos de cáncer humano

5 Para examinar la expresión de hTROP-2 (tasa positiva para hTROP-2) en tejidos de cáncer humano, las matrices de tejido de cáncer de diversas especies de cáncer humano se inmunotñieron usando el clon K5-63-17 del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2. Una sección de tejido, en la que un 10 % o más de células cancerosas estaban teñidas, se definió como positivo para hTROP-2. Los resultados de la tinción se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

| Tejidos de cáncer  | Número de casos positivos para TROP-2 / número total de casos | Tasa positiva para TROP-2 (%) |
|--------------------|---|-------------------------------|
| Cáncer de mama     | <b>32/80</b>  | <b>40</b>                     |
| Cáncer de pulmón   | <b>53/81</b>  | <b>65,4</b>                   |
| Cáncer de esófago  | <b>69/90</b>  | <b>76,7</b>                   |
| Cáncer de estómago | <b>25/90</b>  | <b>27,8</b>                   |
| Cáncer de colon    | <b>29/178</b>   | <b>16,3</b>                   |
| Cáncer pancreático | <b>26/62</b>  | <b>41,9</b>                   |
| Cáncer de hígado   | <b>7/92</b>   | <b>7,61</b>                   |
| Cáncer de vejiga   | <b>42/59</b>  | <b>71,2</b>                   |
| Cáncer de próstata | <b>35/38</b>  | <b>92,1</b>                   |
| Cáncer de ovario   | <b>14/58</b>  | <b>24,1</b>                   |

10 Las imágenes teñidas representativas se muestran en la Figura 21. Entre las especies de cáncer, con respecto a las que se había analizado la expresión de hTROP-2, el cáncer de próstata tenía la tasa positiva más elevada (92,1 %), y también con el cáncer de pulmón (65,4 %), cáncer de esófago (76,7 %), cáncer de vejiga (71,2 %) y similares presentaban tasas positivas elevadas. El cáncer de hígado tenía la tasa positiva más baja (7,61 %). A partir de imágenes teñidas se observó que, al igual que en las células normales, hTROP-2 estaba altamente localizado en la  
15 membrana celular incluso en el caso de células cancerosas (Figura 21A a F, H e I). Además, en algunos casos hTROP-2 también se localizaba en el citoplasma (Figura 21A, B, E y G).

La tasa positiva para hTROP-2 en cáncer pancreático era de un 41,9 %. La relación entre esta tasa positiva para hTROP-2 y el grado (grado de diferenciación) de cáncer pancreático se analizó. Como resultado, hTROP-2 se expresaba a frecuencia elevada en cáncer pancreático con un alto grado, en particular, con un bajo grado de  
20 diferenciación (Tabla 5).

Tabla 5

**26/62 aplicaciones puntuales positivas para hTROP-2 de cáncer pancreático (41,94 %)**

| Grado        | -         | +         | Tasa positiva |
|--------------|-----------|-----------|---------------|
| I            | 8         | 0         | 0 %           |
| I - II       | 5         | 0         | 0 %           |
| II           | 19        | 21        | 52,5 %        |
| I - III      | 4         | 5         | 55,6 %        |
| <b>total</b> | <b>36</b> | <b>26</b> |               |

**p < 0,01**

25 **[Ejemplo 21]**

[Actividad antitumoral de anticuerpo K5-70 con una sola administración en modelos de prevención de xenoinjerto de la línea de células de cáncer pancreático humano PK-59]

30 Se presentaba una fuerte actividad antitumoral *in vivo* de un clon K5-70 (IgG2a de ratón) incluso con una sola administración de K5-70 a una dosificación de 10 mg/kg de peso corporal con respecto a modelos de prevención de xenoinjerto usando una línea de células de cáncer pancreático humano PK-59. En un grupo de control (IgG de ratón, 10 mg/kg de peso corporal, N = 3), se observó formación de tumor en todos los individuos, y el volumen tumoral en el día 28º día después del trasplante celular (Día 28) era  $781,7 \pm 74,5 \text{ mm}^3$ . Por otro lado, en un grupo en el que se  
35 administró K5-70 solo una vez el día de trasplante de las células cancerosas (Día 1) (10 mg/kg de peso corporal,

N = 3), el volumen tumoral el Día 28 era  $144,4 \pm 176,9 \text{ mm}^3$  ( $P < 0,05$  mediante ensayo t de Student), lo que muestra una actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de un 81,5 % (Figura 22A). Con respecto al peso tumoral, el peso del tumor del grupo de control el Día 28 era  $0,59 \pm 0,06 \text{ g}$ . Por el contrario, el peso tumoral del grupo de administración del clon K5-70 era  $0,07 \pm 0,10 \text{ g}$  ( $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student), lo que muestra una actividad inhibitoria de un 88 % (Figura 22B). Con respecto tanto a volumen tumoral como a peso tumoral, la formación de tumor se inhibía completamente en 2 de 3 individuos en el grupo de administración de K5-70 a una dosificación de 10 mg/kg de peso corporal por administración (Figura 22C).

#### [Ejemplo 22]

[Actividad antitumoral de anti-TROP-2 humano anticuerpo monoclonal en modelos de tratamiento de xenoinjerto de la línea de células de cáncer de colon humano SW480]

La actividad antitumoral de cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-TROP-2 humano (clones K5-70, K5-116-2-1, y T6-16) se examinó con modelos de tratamiento de xenoinjerto usando una línea de células de cáncer de colon humano SW480. Las células SW480 ( $5 \times 10^6$  células) se trasplantaron por vía subcutánea en el costado derecho de cada ratón NOD-scid hembra de 6 semanas de edad (Día 1). Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó  $100 \text{ mm}^3$ , se realizó formación de grupos (Día 7 o Día 10). A partir del Día 7 o Día 10, la administración intraperitoneal del anticuerpo se realizó a intervalos de administración de una vez cada tres días. La actividad antitumoral del clon K5-70 y las actividades antitumorales de los clones K5-116-2-1 y T6-16 se evaluaron mediante estudios independientes, por separado. El estudio de evaluación de la actividad antitumoral de K5-70, el volumen tumoral de un grupo de control (IgG de ratón (10 mg/kg de peso corporal), N = 8) el 44º día después del trasplante de células cancerosas (Día 44) era  $365,4 \pm 214,6 \text{ mm}^3$ . Por otro lado, el volumen tumoral de un grupo de administración de K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) era  $27,4 \pm 29,4 \text{ mm}^3$  ( $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student), y por lo tanto, la formación del tumor se veía inhibida de forma significativa en el grupo de administración de K5-70 (tasa de inhibición: 92,5 %) (Figura 23A). Con respecto al peso tumoral, el peso tumoral del grupo de control era  $0,11 \pm 0,07 \text{ g}$ , mientras que el peso tumoral del grupo de administración de K5-70 era  $0,005 \pm 0,007 \text{ g}$  ( $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student), lo que muestra una tasa inhibitoria de un 95,5 % (Figura 23B). En particular, en dos de los ocho ratones individuales en el grupo de administración de K5-70, la formación de tumor estaba completamente inhibida, y la presencia de tumor no se pudo confirmar.

En el estudio de evaluación de las actividades antitumorales de K5-116-2-1 y T6-16, que se realizó por separado, el volumen tumoral del grupo de control el Día 42 era  $713,8 \pm 354,5 \text{ mm}^3$  (N = 8). Por el contrario, el volumen tumoral del grupo de administración de K5-116-2-1 (10 mg/kg de peso corporal) era  $188,9 \pm 97,4 \text{ mm}^3$  (N = 8,  $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student) (Figura 24A), y el volumen tumoral del grupo de administración de T6-16 (10 mg/kg de peso corporal) era  $292,8 \pm 199,7 \text{ mm}^3$  (N = 8,  $P < 0,05$  mediante ensayo t de Student) (Figura 25A). Por lo tanto, los dos grupos de administración mencionados anteriormente mostraban tasas de inhibición de un 73,5 % y un 59,0 %, respectivamente. Con respecto al peso tumoral también, el peso tumoral del grupo de control era  $0,39 \pm 0,19 \text{ g}$ . Por el contrario, el peso tumoral del grupo de administración de K5-116-2-1 era  $0,10 \pm 0,07 \text{ g}$  ( $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student), y el peso tumoral del grupo de administración de T6-16 era  $0,17 \pm 0,14 \text{ g}$  ( $P < 0,05$  mediante ensayo t de Student). Por lo tanto, los dos grupos de administración mencionados anteriormente presentaban tasas de inhibición de un 72,2 % y un 56,4 %, respectivamente (Figura 24B y Figura 25B).

#### [Ejemplo 23]

[Actividad antitumoral dependiente de la dosis del clon K5-70 en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando la línea de células de cáncer de colon humano SW480]

Posteriormente, la actividad antitumoral dependiente de la dosis del clon K5-70 (IgG2a de ratón) se examinó con modelos de tratamiento de xenoinjerto usando una línea de células de cáncer de colon humano SW480. Las células SW480 ( $5 \times 10^6$  células) se trasplantaron por vía subcutánea en el costado derecho de cada ratón NOD-scid hembra de 6 semanas de edad. Diez días después del trasplante (Día 10) momento en el que el volumen tumoral promedio alcanzó  $100 \text{ mm}^3$ , los ratones se dividieron en un grupo de control (IgG de ratón, grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal, N = 8,  $104,4 \pm 17,6 \text{ mm}^3$ ), un grupo de administración de K5-70 (1 mg/kg de peso corporal) (N = 8,  $104,3 \pm 16,1 \text{ mm}^3$ ), un grupo de administración de K5-70 (5 mg/kg de peso corporal) (N = 8,  $104,6 \pm 15,9 \text{ mm}^3$ ), y un grupo de administración de K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (N = 8,  $104,8 \pm 14,9 \text{ mm}^3$ ). A continuación, la administración intraperitoneal se realizó a intervalos de administración de una vez cada tres días. El Día 42, el volumen tumoral del grupo de control era  $713,8 \pm 354,5 \text{ mm}^3$ . Por otro lado, en los grupos de administración de K5-70, se observó actividad inhibitoria de la formación de tumor dependiente de la dosis. Es decir, el volumen tumoral del grupo de administración de 1 mg/kg de peso corporal era  $485,0 \pm 207,3 \text{ mm}^3$  (tasa de inhibición: 32,1 %), el volumen tumoral del grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal era  $339,5 \pm 253,2 \text{ mm}^3$  (tasa de inhibición: 52,4 %), y el volumen tumoral del grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal era  $355,4 \pm 202,8 \text{ mm}^3$  (tasa de inhibición: 50,2 %,  $P < 0,05$  mediante ensayo t de Student) (Figura 26A). De forma análoga, con respecto al peso tumoral el Día 42, el peso tumoral del grupo de control era  $0,39 \pm 0,19 \text{ g}$ . Por otro lado, el peso tumoral del grupo de administración de K5-70 (1 mg/kg de peso corporal) era  $0,24 \pm 0,11 \text{ g}$  (tasa de inhibición: 37,8 %), el peso tumoral del grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal

era  $0,17 \pm 0,14$  g (tasa de inhibición: 55,8 %,  $P < 0,05$  mediante ensayo t de Student), y el peso tumoral del grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal era  $0,20 \pm 0,13$  g (tasa de inhibición: 47,1 %). Por lo tanto, se confirmó una actividad antitumoral dependiente de la dosis (Figura 26B).

#### 5 [Ejemplo 24]

[Análisis de intervalos de administración del clon K5-70 con respecto a modelos de tratamiento xenoinjerto usando la línea de células de cáncer de colon humano SW480]

10 Posteriormente, para analizar los intervalos de administración óptima del clon K5-70 (IgG2a de ratón), la actividad antitumoral del clon K5-70 cuando se administraba una vez a la semana (una vez cada 7 días) se examinó con modelos de tratamiento de xenoinjerto usando una línea de células de cáncer de colon humano SW480. Las células SW480 ( $5 \times 10^6$  células) se trasplantaron por vía subcutánea en el costado derecho de cada ratón NOD-scid hembra de 6 semanas de edad. Diez días después del trasplante (Día 10) momento en el que el volumen tumoral promedio  
 15 alcanzó  $100 \text{ mm}^3$ , los ratones se dividieron en un grupo de control (IgG de ratón, grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal,  $N = 8$ ,  $104,4 \pm 17,6 \text{ mm}^3$ ) y un grupo de administración de K5-70 (10 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana) ( $N = 8$ ,  $104,3 \pm 16,1 \text{ mm}^3$ ). A continuación, la administración intraperitoneal se realizó una vez cada 7 días. El Día 42, el volumen tumoral del grupo de control era  $713,8 \pm 354,5 \text{ mm}^3$ , mientras que el volumen tumoral del grupo de administración de K5-70 (una vez a la semana) era  $323,3 \pm 239,9 \text{ mm}^3$  (tasa de inhibición: 55 %,  $P < 0,05$  mediante ensayo t de Student) (Figura 27A). Además, cuando el intervalo de administración se aumentaba a una vez cada 10 días y a una vez cada dos semanas, el volumen tumoral del grupo de control el Día 39 era  $956,9 \pm 367,8 \text{ mm}^3$ . Por otro lado, el volumen tumoral del grupo de administración de K5-70 (Administrado una vez cada 10 días) el Día 39 era  $525,4 \pm 180,6 \text{ mm}^3$  (tasa de inhibición: 45,1 %,  $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student), y el volumen tumoral del grupo de administración de K5-70 (administrado una vez cada 14 días) era  $459,4 \pm 217,6 \text{ mm}^3$  (tasa de inhibición: 52,0 %,  $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student) (Figura 27B). En las técnicas anteriores (documentos de patente US 7420040 y US 7420041), cuando los anticuerpos se administraban a modelos de tratamiento de xenoinjerto usando una línea de células de cáncer pancreático (BxPC-3) a una dosificación de 20 mg/kg de peso corporal, tres veces a la semana (a intervalos de administración de 2 días), los anticuerpos presentaban actividad antitumoral a una tasa de inhibición de un 50 % a un 60 %. Por el contrario, el anticuerpo K-70 presentaba una actividad antitumoral equivalente a las de las técnicas anteriores, a una dosificación de la mitad de las de las técnicas anteriores (10 mg/kg de peso corporal), una vez cada 2 semanas (a intervalos de administración de 12 días). Si se tienen en cuenta una dosificación individual e intervalos de administración, llega a ser evidente que el anticuerpo K5-70 presentaba una actividad antitumoral significativa a una dosificación total de al menos una doceava parte de las de las técnicas anteriores.

#### 35 [Ejemplo 25]

[Actividad antitumoral dependiente de la dosis del clon T6-16 en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando la línea de células de cáncer de colon humano SW480]

40 Posteriormente, la actividad antitumoral dependiente de la dosis del clon T6-16 (IgG2a de ratón) se examinó con modelos de tratamiento de xenoinjerto usando una línea de células de cáncer de colon humano SW480. Las células SW480 ( $5 \times 10^6$  células) se trasplantaron por vía subcutánea en el costado derecho de cada ratón NOD-scid hembra de 6 semanas de edad. Diez días después del trasplante (Día 10) momento en el que el volumen tumoral promedio  
 45 alcanzó  $100 \text{ mm}^3$ , los ratones se dividieron en un grupo de control (IgG de ratón, grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal,  $N = 8$ ,  $105,8 \pm 9,9 \text{ mm}^3$ ), un grupo de administración de T6-16 (1 mg/kg de peso corporal) ( $N = 8$ ,  $104,4 \pm 13,3 \text{ mm}^3$ ), un grupo de administración de T6-16 (5 mg/kg de peso corporal) ( $N = 8$ ,  $104,7 \pm 13,0 \text{ mm}^3$ ), y un grupo de administración de T6-16 (10 mg/kg de peso corporal) ( $N = 8$ ,  $104,8 \pm 12,4 \text{ mm}^3$ ). A continuación, la administración intraperitoneal se realizó a intervalos de administración de una vez cada tres días. El Día 43, el volumen tumoral del grupo de control era  $473,5 \pm 137,0 \text{ mm}^3$ . Por otro lado, en los grupos de administración de T6-16, se observó actividad inhibitoria de la formación de tumor dependiente de la dosis. Es decir, el volumen tumoral del grupo de administración de 1 mg/kg de peso corporal era  $397,9 \pm 97,5 \text{ mm}^3$  (tasa de inhibición: 16,0 %), el volumen tumoral del grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal era  $195,9 \pm 89,7 \text{ mm}^3$  (tasa de inhibición: 58,7 %,  $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student), y el volumen tumoral del grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal era  $190,2 \pm 56,5 \text{ mm}^3$  (tasa de inhibición: 59,8 %,  $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student) (Figura 28A). De forma análoga, con respecto al peso tumoral el Día 43, el peso tumoral del grupo de control era  $0,19 \pm 0,07$  g. Por otro lado, el peso tumoral del grupo de administración de T6-16 (1 mg/kg de peso corporal) era  $0,20 \pm 0,08$  g, el peso tumoral del grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal era  $0,08 \pm 0,04$  g (tasa de inhibición: 57,9 %,  $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student), y el peso tumoral del grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal era  $0,09 \pm 0,04$  g (tasa de inhibición: 52,6 %,  $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student). Por lo tanto, se confirmó una actividad antitumoral dependiente de la dosis (Figura 28B).

#### [Ejemplo 26]

65 [Análisis de intervalos de administración del clon T6-16 con respecto a modelos de tratamiento de xenoinjerto usando la línea de células de cáncer de colon humano SW480]

Posteriormente, para analizar los intervalos de administración óptima del clon T6-16 (IgG2a de ratón), la actividad antitumoral del clon T6-16 cuando se administraba a intervalos de administración de una vez a la semana (una vez cada 7 días) y una vez cada 10 días se examinó con modelos de tratamiento de xenoinjerto usando una línea de células de cáncer de colon humano SW480. Las células SW480 ( $5 \times 10^6$  células) se trasplantaron por vía subcutánea en el costado derecho de cada uno de los ratones NOD-scid hembra de 6 semanas de edad. Diez días después del trasplante (Día 10) momento en el que el volumen tumoral promedio alcanzó  $100 \text{ mm}^3$ , los ratones se dividieron en un grupo de control (IgG de ratón, grupo de administración de  $10 \text{ mg/kg}$  de peso corporal,  $N = 8$ ,  $105,8 \pm 9,9 \text{ mm}^3$ ), un grupo de administración de T6-16 ( $10 \text{ mg/kg}$  de peso corporal, una vez a la semana) ( $N = 8$ ,  $105,0 \pm 11,6 \text{ mm}^3$ ), un grupo de administración de T6-16 ( $10 \text{ mg/kg}$  de peso corporal, una vez cada 10 días) ( $N = 5$ ,  $130,8 \pm 2,4 \text{ mm}^3$ ). A continuación, la administración comenzó. El Día 43, el volumen tumoral del grupo de control era  $473,5 \pm 137,0 \text{ mm}^3$ . Por otro lado, el volumen tumoral del grupo de administración de T6-16 (una vez a la semana) era  $243,7 \pm 65,3 \text{ mm}^3$  (tasa de inhibición:  $48,5 \%$ ,  $P < 0,01$  mediante ensayo t de Student), y el volumen tumoral del grupo de administración de T6-16 (una vez cada 10 días) era  $297,8 \pm 54,4 \text{ mm}^3$  (tasa de inhibición:  $37,1 \%$ ,  $P < 0,05$  mediante ensayo t de Student) (Figura 29). En las técnicas anteriores (documentos de patente US 7420040 y US 7420041), cuando los anticuerpos se administraban a modelos de tratamiento de xenoinjerto usando una línea de células de cáncer pancreático (BxPC-3) a una dosificación de  $20 \text{ mg/kg}$  de peso corporal, tres veces a la semana (a intervalos de administración de 2 días), los anticuerpos presentaban actividad antitumoral a una tasa de inhibición de un  $50 \%$  a un  $60 \%$ . Por el contrario, se encontró que el anticuerpo T6-16 presentaba una actividad antitumoral significativa, cuando se administraba a una dosificación de la mitad de las de las técnicas anteriores una vez cada 10 días (a intervalos de administración de 8 días). Si se tienen en cuenta una dosificación individual e intervalos de administración, llega a ser evidente que el anticuerpo T6-16 presentaba una actividad antitumoral significativa a una dosificación total de al menos una octava parte de las de las técnicas anteriores.

#### [Ejemplo 27]

[Análisis de actividad antitumoral del clon K5-70 en modelos de prevención de xenoinjerto usando la línea de células de cáncer de próstata humano DU-145]

La actividad antitumoral del clon K5-70 en el cáncer de próstata humanos se evaluó con modelos de prevención de xenoinjerto usando células DU-145 (Banco de Células RIKEN, RCB2143). Las células DU-145 ( $5 \times 10^6$  células) se trasplantaron por vía subcutánea en cada uno de los ratones atímicos hembra de 6 semanas de edad (Balb/c, nu/nu). El día en el que se realizó el trasplante se definió como Día 1. Los ratones se dividieron en un grupo de control ( $N = 8$ ) y un grupo de administración de K5-70 ( $N = 8$ ). A partir del Día 1, K-70 se administró por vía intraperitoneal a los ratones a una frecuencia de una vez cada 3 días a una dosificación de  $10 \text{ mg/kg}$  de peso corporal. El Día 40, el volumen tumoral del grupo de control era  $368,2 \pm 307,8 \text{ mm}^3$ . Por otro lado, el volumen tumoral del grupo de administración de K5-70 era  $30,6 \pm 29,6 \text{ mm}^3$  ( $P < 0,05$  mediante ensayo t de Student), lo que muestra una actividad inhibitoria de la formación del tumor de aproximadamente un  $90 \%$  (Figura 30A). Con respecto al peso tumoral, además se observó una actividad antitumoral significativa. El peso tumoral del grupo de control el Día 40 era  $0,18 \pm 0,18 \text{ g}$ . Por el contrario, en el grupo de administración de K5-70, los tumores desaparecieron de los 8 Ratones individuales, y por lo tanto, la formación de tumor estaba completamente inhibida (Figura 30B). A partir de los resultados mencionados anteriormente, llegó a ser evidente que el clon K5-70 del anticuerpo monoclonal anti-TROP-2 humano muestra una fuerte actividad antitumoral incluso en el cáncer de próstata humano.

#### [Ejemplo 28]

[Actividad inhibitoria de la metástasis del clon K5-70 en modelos de metástasis de hígado usando la línea de células de cáncer pancreático humano PK-59]

La metástasis del cáncer es un factor importante que influye en el pronóstico clínico en el tratamiento del cáncer gastrointestinal. El control de la metástasis es, de forma terapéutica, significativamente importante. Si se pudiera suprimirlo solamente la formación de tumores sino también la metástasis del cáncer a otros órganos mediante la administración de un anticuerpo para uso en terapia para el cáncer que se dirigiera a TROP-2, se podría anticipar una utilidad clínica. Por lo tanto, esta es una propiedad deseada como un anticuerpo terapéutico para el cáncer.

La expresión de TROP-2 se confirmó en muchos tipos de carcinomas. Se informó que TROP-2 se expresaba a un nivel particularmente elevado en focos de metástasis (Br. J. Cancer (2008); 99: 1290-1295, Clin. Cancer Res. (2006); 12: 3057-3063, Mod. Pathol. (2008); 21: 186-191). Además, también se informó que, cuando las células cancerosas introducidas en el gen TROP-2 se trasplantaban en ratones atímicos a través de administración transesplénica o transpancreática, la incidencia de metástasis en hígado aumentaba (documento WO 2010/089782, Molecular Cancer (2010); 9: 253), y por lo tanto, el informe sugería la importancia de TROP-2 en el proceso de metástasis del cáncer. Sin embargo, hasta la fecha, no ha habido informes que describan de forma específica que un anticuerpo que se dirija a TROP-2 tenga acción inhibitoria de la metástasis *in vivo*.

El clon K5-70 del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2, que se descubrió con la presente invención, presenta efectos terapéuticos elevados en modelos de xenoinjerto, en la hipodermis de la que se habían trasplantado células de cáncer pancreático. Mediante un ensayo de raspado realizado *in vitro* se demostró que el anticuerpo K5-70 era

capaz de suprimir la capacidad de migración de las células de cáncer pancreático PK-59, además de realizar una supresión del crecimiento de las células cancerosas. Por lo tanto, se consideró que el anticuerpo K5-70 podía inhibir la metástasis del cáncer *in vivo*. por lo tanto, se examinó el efecto de inhibición de la metástasis de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-hTROP-2, usando modelos en los que las células de cáncer pancreático PK-59 se inyectaban en el bazo de ratones atímicos de modo que se desarrolló metástasis de hígado.

Una línea de células de cáncer pancreático (PK-59) que expresan hTROP-2 de forma endógena se recogió mediante tratamiento con tripsina, y a continuación se preparó una suspensión de  $2 \times 10^7$  células/ml con PBS. La suspensión celular se conservó en hielo hasta el trasplante. Cada ratón atímico hembra de 6 o 7 semanas de edad (Balb/c, nu/nu) se anestesia mediante administración intraperitoneal de pentobarbital, y de 10 a 15 mm del costal izquierdo de los mismos se extirpó con anestesia. El bazo se retiró de la cavidad abdominal, y a continuación se inyectaron 50  $\mu$ l de la suspensión celular ( $1 \times 10^6$  células) en el bazo usando una jeringa de calibre 26G. Cuatro minutos después de la inyección de las células, el hilio del bazo se suturó con suturas de seda de 5-0, y a continuación el bazo se extirpó. El peritoneo cortado se cerró con suturas de seda de 5-0, y el sitio quirúrgico se cerró a continuación con Clips para Heridas (AUTOCLIP 9 mm, Becton Dickinson). El día antes del trasplante de células cancerosas, los ratones se dividieron en grupos. Un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (K5-70) o un anticuerpo de control (IgG de ratón purificada) se administró por vía intraperitoneal a ratones a una dosificación de 10 mg/kg de peso corporal. Además, siete días después del trasplante de células cancerosas, un anticuerpo de este tipo se administró de la misma manera como se ha descrito anteriormente. De cuatro a seis semanas después del trasplante de células cancerosas, los ratones se sometieron a eutanasia mediante dislocación cervical. A continuación, el hígado se extirpó de cada ratón, y se confirmó la presencia o ausencia de focos metastásicos.

En el grupo de control en el que la IgG de ratón se administraba a los ratones, en 4 de los 6 ratones en los que se habían trasplantado células PK-59, se observaron focos metastásicos aparentes (de 2 a 7 focos) alrededor del lóbulo del hígado de cuatro a seis semanas después del trasplante (Figura 31A, incidencia de metástasis: 67 %, Tabla 6). Por el contrario, en cuatro ratones en el grupo de administración de K5-70, en los que también se habían trasplantado células PK-59, los focos metastásicos de este tipo no se observaban en el hígado de ninguno de los ratones, y por lo tanto, una incidencia de metástasis era de un 0 % (Figura 31B, Tabla 6).

Tabla 6

Efecto de supresión de metástasis del clon K5-70 en modelos de metástasis de hígado producido por trasplante transesplénico de células PK-59 en ratones atímicos

| Grupo de administración          | Semanas después del trasplante | N.º del individuo | Número de focos metastásicos          | Determinación de metástasis           |                          |                          |
|----------------------------------|--------------------------------|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Grupo de control                 | 4W                             | C-1               | 0                                     | -                                     |                          |                          |
| Grupo de control                 | 4W                             | C-2               | 5                                     | ++                                    |                          |                          |
|                                  | 6W                             | C-3               | 7                                     | ++                                    |                          |                          |
|                                  | 6W                             | C-4               | 7                                     | ++                                    |                          |                          |
|                                  | 6W                             | C-5               | 2                                     | +                                     |                          |                          |
|                                  | 6W                             | C-6               | 0                                     | -                                     |                          |                          |
|                                  |                                |                   |                                       | Número promedio de focos metastásicos | 3,5                      | Incidencia de metástasis |
| Grupo de administración de K5-70 | 4W                             | K-1               | 0                                     |                                       |                          |                          |
|                                  | 6W                             | K-2               | 0                                     |                                       |                          |                          |
|                                  | 6W                             | K-3               | 0                                     |                                       |                          |                          |
|                                  | 6W                             | K-4               | 0                                     |                                       |                          |                          |
|                                  |                                |                   | Número promedio de focos metastásicos | 0                                     | Incidencia de metástasis | 0 %                      |

A partir de estos resultados, llegó a ser evidente que el anticuerpo K5-70 anti-hTROP-2 tiene una acción inhibitoria extremadamente fuerte en la metástasis de hígado en las células de cáncer pancreático PK-59.

**[Ejemplo 29]**

[Actividad antitumoral del anticuerpo K5-70 en modelos de xenoinjerto usando la línea de células de cáncer de colon SW480, que son modelos de cáncer recurrente después de administración de clorhidrato de irinotecán]

5 En los últimos años, muchos fármacos quimioterapéuticos para suprimir el crecimiento de células cancerosas se han desarrollado como fármacos terapéuticos. Estos fármacos han conseguido ciertos resultados en el tratamiento. Sin embargo, estos fármacos quimioterapéuticos han sido problemáticos en términos de efectos secundarios asociados con la acción sucesora del crecimiento de las mismas en células normales en vez de en células cancerosas y la

10 recurrencia del cáncer después de suspensión del tratamiento. Por consiguiente, si se pudiera suprimir la recurrencia tumoral después de finalizar el tratamiento con fármacos quimioterapéuticos Mediante administración de un anticuerpo terapéutico para el cáncer dirigido contra TROP-2, se podrían anticipar utilidades clínicas elevadas. Por lo tanto, se trata de una propiedad deseada como un anticuerpo terapéutico para el cáncer.

15 Como agentes terapéuticos para el cáncer de colon, además de fármacos que contienen 5-FU y platino, recientemente se ha aplicado clorhidrato de irinotecán (Topotecin, Daiichi Sankyo Co., Ltd.) a sitios clínicos, que tiene un efecto inhibitorio de topoisomerasa. Con respecto a modelos animales también, también se informó del efecto antitumoral del clorhidrato de irinotecán en modelos de ratón, en los se habían trasplantado diversos tipos de células de tumorales humanas incluyendo cáncer de colon como un ejemplo habitual (Cancer Chemother

20 Pharmacol. (1991); 28 (3): 192-8). Por lo tanto, el efecto de prevención de la recurrencia del clon K5-70 del anticuerpo anti-hTROP-2 (IgG2a de ratón) en tumor recurrente después de administración de clorhidrato de irinotecán se ha examinado con modelos de xenoinjerto usando una línea de células de cáncer de colon humano SW480. Las células SW480 ( $5 \times 10^6$  células) se trasplantaron por vía subcutánea en el costado derecho de ratones NOD-scid hembra de 8 semanas de edad. Once días después del trasplante (Día 11) momento en el que el volumen tumoral promedio alcanzó  $100 \text{ mm}^3$ , los ratones se dividieron en un grupo sin tratamiento (grupo de administración de solución salina normal,  $N = 8$ ,  $130,7 \pm 16,2 \text{ mm}^3$ ) y un grupo de administración de clorhidrato de irinotecán (CPT-

25 11, Topotecin, Daiichi Sankyo Co., Ltd.) ( $N = 16$ ,  $123,0 \pm 21,4 \text{ mm}^3$ ). A partir de ese momento, el clorhidrato de irinotecán se administró por vía intraperitoneal a los ratones a una dosificación de 40 mg/kg de peso corporal, una vez cada 3 días, 3 veces en total (Días 11, 14, y 17). El tercer día después de la administración final de clorhidrato de irinotecán (Día 20), el volumen tumoral del grupo sin tratamiento alcanzó  $232,1 \pm 21,1 \text{ mm}^3$ . Por otro lado, el volumen tumoral del grupo de administración de clorhidrato de irinotecán era  $126,6 \pm 26,6 \text{ mm}^3$  ( $P < 0,01$  con el ensayo t de Student), y por lo tanto, se observó un efecto de supresión tumoral aparente. En esta etapa, el grupo de administración de clorhidrato de irinotecán se dividió en dos grupos basándose en el tamaño del tumor. Un grupo se definió como un grupo de administración de K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) ( $N = 8$ , volumen tumoral el Día 20:

35  $126,0 \pm 28,0 \text{ mm}^3$ ), y el otro grupo se definió como un grupo de administración de IgG de ratón (10 mg/kg de peso corporal) ( $N = 8$ , tamaño del tumor el Día 20:  $127,2 \pm 27,0 \text{ mm}^3$ ). La administración intraperitoneal y la medición del volumen tumoral se realizaron en cada grupo una vez cada 3 días, de modo que se evaluó la recurrencia del tumor (Figura 32). En el grupo de administración de IgG de ratón desde el 18º día después de la administración final de clorhidrato de irinotecán (Día 35), se observaron varios ratones que tenían un tumor recurrente aparente con volumen tumoral superior a  $300 \text{ mm}^3$ . En el 30º día después de la administración final de clorhidrato de irinotecán (Día 47), se observó un tumor con un volumen tumoral superior a  $300 \text{ mm}^3$  en 5 de los 8 ratones (volumen tumoral promedio:  $401,7 \pm 172,7 \text{ mm}^3$ ). Por el contrario, en el grupo de administración de K5-70, la recurrencia del tumor se suprimió de forma significativa, y el volumen tumoral promedio era  $180,5 \pm 142,1 \text{ mm}^3$  ( $P < 0,05$  mediante ensayo t de Student) (Figura 32). En particular, en el grupo de administración de K5-70, el volumen tumoral el Día 47 llevó a ser más pequeño que el volumen tumoral cuando los ratones se dividieron en grupos ( $126,0 \pm 28,0 \text{ mm}^3$ ). El volumen tumoral llegó a ser inferior a  $100 \text{ mm}^3$  en 4 de los 8 ratones. A partir de estos resultados, llegó a ser evidente que el anticuerpo K5-70 anti-hTROP-2 tenía una acción supresora extremadamente fuerte incluso en el tumor recurrente después de la administración de clorhidrato de irinotecán.

**[Ejemplo 30]**

[Formación de mapas de epítomos usando tecnología CLIPS]

<Materiales y métodos >

55

Síntesis de péptidos

Los péptidos lineales 15-mer y 30-mer obtenidos a partir de dominios extracelulares de TROP-2, que se usaron en el presente experimento, se obtuvieron mediante síntesis en fase sólida de acuerdo con un método de Fmoc (9-Fluorenilmetoxicarbonilo). Además, para análisis de epítomo discontinuo, se sintetizó un péptido 17-mer obtenido a partir de un dominio extracelular de TROP-2, a cuyos extremos se habían añadido restos de cisteína, y una conformación con una o dos estructuras de lazo se reconstruyó mediante tecnología CLIPS (Tecnología de Péptidos Químicamente unidos en Armazones). Cuando otro resto de cisteína estaba presente cerca del resto de cisteína añadido, éste se sustituía con alanina.

65



ELISA de identificación sistemática de epítipo

5034 tipos de los péptidos sintetizados estaban unidos covalentemente a tarjetas PEPSCAN (455 péptidos/tarjeta), y la unión de los péptidos sintetizados a anticuerpos se analizó a continuación con el método de ELISA. Se permitió que las tarjetas PEPSCAN reaccionaran con anticuerpos monoclonales anti-TROP-2 humano (K5-70, K5-107, K5-116-2-1, T5-86, y T6-16) que se habían diluido hasta una concentración de 1 µg/ml con un tampón de bloqueo (un tampón fosfato que contenía suero de caballo al 4 %, ovoalbúmina al 5 %, Tween al 1 %). Después de del lavado, se permitió que el producto reaccionara con un complejo de peroxidasa-anticuerpo secundario diluido 1000 veces a 25 °C durante 1 hora. Después del lavado, a la solución de reacción se le añadió una solución de sustrato (una solución que contenía sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina (ABTS) y 2 µl de solución de peróxido de hidrógeno al 3 %), seguido de una reacción cromogénica durante 1 hora. La actividad de unión de los anticuerpos se cuantificó mediante fotografía con una cámara CCD y a continuación realizando un análisis de imágenes.

## &lt;Resultados&gt;

Los anticuerpos monoclonales anti-TROP-2 humano, K5-70, K5-107, K5-116-2-1, T5-86 y T6-16, que presentaban efectos beneficiosos, se sometieron a análisis de epítipos usando tecnología CLIPS (Péptidos Químicamente Unidos en Armazones). Se debe indicar que la expresión "número del aminoácido" se usa en los presentes ejemplos para hacer referencia al número del aminoácido en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 (proteína hTROP-2 (323 restos de aminoácido)).

El resultado del análisis para el anticuerpo K5-70 se muestra en la Tabla 7 que sigue a continuación. Como resultado, se encontró que 33 péptidos presentaban una fuerte actividad de unión con respecto al anticuerpo K5-70. En estos 33 péptidos, una secuencia que comprendía VCSPDGGGRCQCRALGSGMAVD (números de aminoácidos 43-65) ((péptidos N.<sup>os</sup> 1-7 y 9 en la Tabla 7), una secuencia que comprendía HHILIDLRHRPTAG (números de aminoácidos 152-165) ((péptidos N.<sup>os</sup> 14, 22-25, 28, 29, 31 y 33 en la Tabla 7), una secuencia que comprendía VHVEQPTIQIELRQ (números de aminoácidos 193-206) ((péptidos N.<sup>os</sup> 8, 10, 12, 13, 15, 18, 20, 21, 23, 26, 28, 30 y 32 en la Tabla 7), y una secuencia que comprendía DLDAELRRLFRER (números de aminoácidos 171-183) ((péptidos N.<sup>os</sup> 11, 12, 14, 16, 18, 19, 21, 22, 25, 29 y 31 en la Tabla 7) aparecieron repetidamente. El anticuerpo K5-70 se unía de forma particularmente fuerte a la secuencia que comprende VCSPDGGGRCQCRALGSGMAVD. A partir de estos resultados, se sugirió que, en la proteína hTROP-2, es probable que los 4 tipos mencionados anteriormente de regiones de secuencias específicas sea epítipos del anticuerpo K5-70.

Tabla 7

| Unión del anticuerpo K5-70 a péptidos CLIPS obtenidos a partir de dominios extracelulares de TROP-2 humano |  |                |
|--|--|----------------|
| número   | péptido                                  | unión de K5-70 |
| 1  | <b>NKMTVCSPDGGGRCQCRALGSGMAVDCST</b>     | <b>2742</b>    |
| 2  | <b>TVCSFDGPGSRCQCRALSSGMAVDCSTLTS</b>    | <b>2604</b>    |
| 3  | <b>TNKMTVCSPDGGGRCQCRALGSGMAVDCS</b>     | <b>2562</b>    |
| 4  | <b>MTVCSPDGGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT</b>     | <b>2402</b>    |
| 5  | <b>KMTVCSPDGGGRCQCRALGSGMAVDCSTL</b>     | <b>1770</b>    |
| 6  | <b>PTNKMTVCSPDGGGRCQCRALGSGMAVDC</b>     | <b>1391</b>    |
| 7  | <b>VCSFDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK</b>    | <b>932</b>     |
| 8  | <b>CAAVHVEQPTIQIELRCAAVHVEQPTIQIELRC</b> | <b>876</b>     |
| 9  | <b>CPTNKMTVCSPDGGGRCQCRALGSGMAVD</b>     | <b>839</b>     |
| 10   | <b>CVHVEQPTIQIELRQNCVHVEQPTIQIELRQNC</b> | <b>825</b>     |
| 11   | <b>HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC</b>  | <b>725</b>     |
| 12   | <b>RLFRERYRLHPKFVAAVHVEQPTIQIELRQ</b>    | <b>687</b>     |
| 13   | <b>AVHVEQPTIQIELRQ</b>                   | <b>642</b>     |
| 14   | <b>CAGAFNHSDLDAELRRCHHILIDLRHRPTAGAC</b> | <b>624</b>     |
| 15   | <b>CPKFVAAVHVEQPTIQCGLDLVRGEPLQVERC</b>  | <b>579</b>     |
| 16   | <b>CHSDLDAELRRLFRERCGLD</b>              | <b>538</b>     |
| 17   | <b>FQGRGGLDLRVRGEP</b>                   | <b>538</b>     |

| Unión del anticuerpo K5-70 a péptidos CLIPS obtenidos a partir de dominios extracelulares de TROP-2 humano |                                    |                |
|--|------------------------------------|----------------|
| número   | péptido                            | unión de K5-70 |
| 18   | CVHYEQPTIQIELRQNCDLDAELRRLFRERYRC  | 524            |
| 19   | CHSDLDAELRRLFRERCRGE               | 519            |
| 20   | CTIQIELRQNTSQKAACVHYEQPTIQIELRQNC  | 513            |
| 21   | CVHYEQPTIQIELRQNCCHSDLDAELRRLFRERC | 511            |
| 22   | CHHILIDLRHRPTAGACHSDLDAELRRLFRERC  | 489            |
| 23   | CHHILIDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC  | 489            |
| 24   | CHHILIDLRHRPTAGACGLDLRVRGEPLQVERC  | 488            |
| 25   | CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC  | 483            |
| 26   | CVHYEQPTIQIELRQNC                  | 483            |
| 27   | CAFNHSDLDAELRRLFCVHYEQPTIQIELRQNC  | 478            |
| 28   | CVHYEQPTIQIELRQNCCHHILIDLRHRPTAGAC | 473            |
| 29   | CDLDAELRRLFRERYRCDELVRTHHILIDLRHC  | 472            |
| 30   | VHYEQPTIQIELRQNCGLDLRVRGEPLQVERC   | 470            |
| 31   | CDELVRTHHILIDLRHC DLDAELRRLFRERYRC | 469            |
| 32   | AVHYEQPTIQIELRQCAVHYEQPTIQIELRQC   | 468            |
| 33   | CHSDLDAELRRLFRERCDELVRTHHILIDLRHC  | 466            |

El resultado del análisis para el anticuerpo K5-107 se muestra en la Tabla 8 que sigue a continuación. Como resultado, se encontró que una secuencia que comprende VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD (números de aminoácidos 43-65) estaba contenida en 10 de los 20 péptidos (péptidos N.<sup>os</sup> 1-6, 8, 13,14 y 17 en la Tabla 8) (Tabla 8).

Por consiguiente, se sugirió que, en la proteína hTROP-2, la región de la secuencia peptídica mencionada anteriormente que consiste en VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD puede ser un epítipo del anticuerpo K5-107.

Tabla 8

Unión del anticuerpo K5-107 a péptidos CLIPS obtenidos a partir de dominios extracelulares de TROP-2 humano

| número | péptido                           | unión de K5-107 |
|--------|-----------------------------------|-----------------|
| 1      | TNKMTVCSPDGP GG RCQCRALGSG MAVDCS | 2763            |
| 2      | NKMTVCSPDGP GGRCQCRALGSGMAVDCST   | 2761            |
| 3      | KMTVCSPDGP GGRCQCRALGSGMAVDCSTL   | 2752            |
| 4      | MTVCSPDGP GGRCQCRALGSGMAVDCSTLT   | 2726            |
| 5      | CPTNKMTVCSPDGP GGRCQCRALGSGMAVD   | 2723            |
| 6      | TVCSPDGP GGRCQCRALGSGMAVDCSTLTS   | 2720            |
| 7      | TCPTNKMTVCSPDGP GGRCQCRALGSGMAV   | 2716            |
| 8      | VCSPDGP GGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK   | 2689            |
| 9      | CSPDGP GGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK    | 2655            |
| 10     | CTCPTNKMTVCSPDGP GGRCQCRALGSGMA   | 2655            |
| 11     | NCTCPTNKMTVCSPDGP GGRCQCRALGSGM   | 2207            |
| 12     | DNCTCPTNKMTVCSPDGP GGRCQCRALGSG   | 1816            |
| 13     | TNKMTVCSPDGP GGRCQCRALGSGMAVDCS   | 1525            |
| 14     | CTVCSPDGP GGRCQCRALGSGMAVDASTLTSK | 1118            |

Unión del anticuerpo K5-107 a péptidos CLIPS obtenidos a partir de dominios extracelulares de TROP-2 humano

| número | péptido                           | unión de K5-107 |
|--------|-----------------------------------|-----------------|
| 15     | QDNCTCPTNKMTVCSPDGGGRCQCRALGS     | 874             |
| 16     | SPDGGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKCL     | 561             |
| 17     | CTNKMTVCSPDGGGRCQCRALGSGMAVDASTC  | 380             |
| 18     | TVCSPDGGGRCQCR                    | 312             |
| 19     | CAPKNARTLVRPSEHACARTLVRPSEHALVDNC | 284             |
| 20     | HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC  | 272             |

El resultado del análisis para el anticuerpo K5-116-2-1 se muestra en la Tabla 9 que sigue a continuación. En este análisis, tres tipos de secuencias específicas, en particular, una secuencia que comprendía VCSPDGGGRCQCRALGSGMAVD (números de aminoácidos 43-65) ((péptidos N.<sup>os</sup> 1-7, 15 y 25 en la Tabla 9), una secuencia que comprendía HHILIDLRHRPTAG (números de aminoácidos 152-165) ((péptidos N.<sup>os</sup> 8-11, 16, 17, 19, 20, 22-24, y 27-29 en la Tabla 9), y una secuencia que comprendía DLDAELRRLFRER (números de aminoácidos 171-183) ((péptidos N.<sup>os</sup> 11-14, 17, 19, 21, 23 y 29 en la Tabla 9) aparecían varias veces (Tabla 9). Por consiguiente, se sugirió que, en la proteína hTROP-2, estos tres tipos de relaciones de secuencia peptídica puedan ser epítomos del anticuerpo K5-116-2-1.

Tabla 9

Unión del anticuerpo K5-116-2-1 a péptidos CLIPS obtenidos a partir de dominios extracelulares de TROP-2 humano

| número | péptido                            | unión de K5-116-2-1 |
|--------|------------------------------------|---------------------|
| 1      | TVCSPDGGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTS      | 2672                |
| 2      | NKMTVCSPDGGGRCQCRALGSGMAVDCST      | 2613                |
| 3      | TNKMTVCSPDGGGRCQCRALGSGMAVDCS      | 2482                |
| 4      | MTVCSPDGGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT      | 2440                |
| 5      | KMTVCSPDGGGRCQCRALGSGMAVDCSTL      | 2423                |
| 6      | CPTNKMTVCSPDGGGRCQCRALGSGMAVD      | 2136                |
| 7      | PTNKMTVCSPDGGGRCQCRALGSGMAV DC     | 1723                |
| 8      | CAGAFNHSDLDAELRRCHHILIDLRHRPTAGAC  | 1643                |
| 9      | CTHHILIDLRHRPTAGC                  | 1586                |
| 10     | CVHYEQPTIQIELRQNCHHILIDLRHRPTAGAC  | 1504                |
| 11     | CHHILIDLRHRPTAGCHSDLDAELRRLFRERC   | 1475                |
| 12     | HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC   | 1467                |
| 13     | CDAELRRLFRERYRLHCHSDLDAELRRLFRERC  | 1462                |
| 14     | CDAELRRLFRERYRLHCPK                | 1442                |
| 15     | VCSPDGGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK      | 1432                |
| 16     | DLSLRCDELVRTHHILIDLRHRPTAGAFNH     | 1421                |
| 17     | CDELVRTHHILIDLRHCDLDAELRRLFRERYRC  | 1392                |
| 18     | CFQGRGGLDLRVRGEPK                  | 1376                |
| 19     | CDAELRRLFRERYRLHCDDELVRTHHILIDLRHC | 1366                |
| 20     | CGLDLRVRGEPQLQVERCHHILIDLRHRPTAGAC | 1342                |
| 21     | CHSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC  | 1331                |
| 22     | CDELVRTHHILIDLRHCHHILIDLRHRPTAGAC  | 1323                |
| 23     | CDAELRRLFRERYRLHCDDELVRTHHILIDLRHC | 1266                |

Unión del anticuerpo K5-116-2-1 a péptidos CLIPS obtenidos a partir de dominios extracelulares de TROP-2 humano

| número | péptido                            | unión de K5-116-2-1 |
|--------|------------------------------------|---------------------|
| 24     | CHHILIDLRHRPTAGACRGEPLQVERTLIYYLC  | 1229                |
| 25     | CSPDGGPGGRCQCRAL                   | 1227                |
| 26     | CTVASPDGPGGRAQARACVHYEQPTIQIELRQNC | 1223                |
| 27     | CHHILIDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC  | 1222                |
| 28     | LSLRCDLVRTHHILIDLRHRPTAGAFNHS      | 1220                |
| 29     | CDELVRTHHILIDLRHCHSDLDAELRRLFRERC  | 1205                |

Los resultados de los análisis de los anticuerpos T5-86 y T6-16 se muestran en la Tabla 10 y en la Tabla 11 que siguen a continuación, respectivamente. En estos análisis, los anticuerpos se unían fuertemente a un péptido que comprendía una secuencia que consiste en DPEGRFKAR-QCN (números de aminoácidos 109-120). La secuencia peptídica mencionada anteriormente estaba comprendida en 22 de los 26 péptidos que se unen al anticuerpo T5-86 ((péptidos N.<sup>os</sup> 1-3, 5-8, 10-13, 15-19, y 21-26 en la Tabla 10), y estaba comprendida en 4 de los 26 péptidos que se unen al anticuerpo T6-16 (péptidos N.<sup>os</sup> 1, 2, 9 y 13 en la Tabla 11) (Tabla 10 y Tabla 11). Además, en el análisis con respecto al anticuerpo T5-86, una secuencia distinta a la que comprendía DPEGRFKARQCN (números de aminoácidos 109-120), una secuencia que comprendía VCSPDGGPGGRCQCR (números de aminoácidos 43-56) ((péptidos N.<sup>os</sup> 4, 14 and 20 en la Tabla 10) aparecía varias veces. Además, también en el análisis con respecto al anticuerpo T6-16, otra secuencia que comprendía HHILIDLRHRPTAG (números de aminoácidos 152-165) ((péptidos N.<sup>os</sup> N.º 4-8, 10-12, 19, 21, 23, 25 y 26 en la Tabla 11) se encontró varias veces. Por consiguiente, se sugirió que, en la proteína hTROP-2, dos tipos de regiones de secuencia peptídica, en particular, DPEGRFKARQCN (números de aminoácidos 109-120) y VCSPDGGPGGRCQCR (números de aminoácidos 43-56), pueden ser epítipo del anticuerpo K5-86. También se sugirió que, en la proteína hTROP-2, dos tipos de reacciones de secuencia peptídica, en particular, DPEGRFKARQCN (números de aminoácidos 109-120) y HHILIDLRHRPTAG (números de aminoácidos 152-165), pueden ser epítipos del anticuerpo T6-16.

Tabla 10

Unión del anticuerpo T5-86 a péptidos CLIPS obtenidos a partir de dominios extracelulares de TROP-2 humano

| número | péptido                           | unión de T5-86 |
|--------|-----------------------------------|----------------|
| 1      | CYDPDADPEGRFKARQCADPEGRFKARQANQTC | 2306           |
| 2      | PDCDPEGRFKARQCN                   | 2292           |
| 3      | CADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC   | 2287           |
| 4      | VCSPDGGPGGRCQCRA                  | 2263           |
| 5      | CYDPDADPEGRFKARQCPDADPEGRFKARQANC | 2260           |
| 6      | CADPEGRFKARQANQTCTPDADPEGRFKARQC  | 2240           |
| 7      | CADPEGRFKARQANQTCYDPDADPEGRFKARQC | 2208           |
| 8      | DCDPEGRFKARQCNQ                   | 2150           |
| 9      | CTVASPDGPGGRAQARCHSDLDAELRRLFRERC | 2086           |
| 10     | CDADPEGRFKARQANQCDADPEGRFKARQANQC | 2035           |
| 11     | DGRFKARQANQTSVAWCARTLVRPSEHALVDNC | 2019           |
| 12     | DADPEGRFKARQANQTCPDADPEGRFKARQANC | 1980           |
| 13     | CPDADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC | 1950           |
| 14     | CSPDGGPGGRCQCRAL                  | 1946           |
| 15     | CEGRFKARQANQTSVACEGRFKARQANQTSVAC | 1895           |
| 16     | CTVASPDGPGGRAQARCPDADPEGRFKARQANC | 1890           |
| 17     | CGLYDPDADPEGRFKACPDADPEGRFKARQANC | 1857           |
| 18     | DPDCDPEGRFKARQCNQTSVCWCVNSVGVR    | 1850           |
| 19     | CPEGRFKARQANQTSVCDLVRHHILIDLRHC   | 1841           |

| Unión del anticuerpo T5-86 a péptidos CLIPS obtenidos a partir de dominios extracelulares de TROP-2 humano |  |                |
|--|--|----------------|
| número   | péptido                                  | unión de T5-86 |
| 20   | <b>CPDGPGGRAQARALGSCHSDLDAELRRLFRERC</b> | <b>1830</b>    |
| 21   | <b>CTLVRPSEHALVDNDGCGRFKARCANTSVAWC</b>  | <b>1820</b>    |
| 22   | <b>CPDADPEGRFKARQANCYDPDADPEGRFKARQC</b> | <b>1795</b>    |
| 23   | <b>CGLYDPDADPEGRFKACPEGRFKARQANQTSVC</b> | <b>1793</b>    |
| 24   | <b>YDPDCDPEGRFKARQ</b>                   | <b>1775</b>    |
| 25   | <b>CPDADPEGRFKARQANCADPEGRFKARQANQTC</b> | <b>1773</b>    |
| 26   | <b>CDPEGRFKARQCNT</b>                    | <b>1772</b>    |

Tabla 11

| Unión del anticuerpo T6-16 a péptidos CLIPS obtenidos a partir de dominios extracelulares de TROP-2 humano |   |                |
|--|---|----------------|
| número   | péptido                                   | unión de T6-16 |
| 1  | <b>CVNSVGVRRTDKGDLSCPDADPEGRFKARQC</b>    | 1072           |
| 2  | <b>CSVGVRRTDKGDLRLCYDPDADPEGRFKARQC</b>   | 786            |
| 3  | HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC          | 714            |
| 4  | CDELVRTHHILIDLRHCDLDAELRRLFRERYRC         | 713            |
| 5  | CVNSVGVRRTDKGDLRLCDELVRTHHILI             | 688            |
| 6  | VRRTDKGDLRLCDELVRTHHILIDLRHRP             | 670            |
| 7  | CVERTLIYYLDEIPPCKHHILIDLRHRPTAGAC         | 626            |
| 8  | CHHILIDLRHRPTAGACHSDLDAELRRLFRERC         | 620            |
| 9  | <b>CVNSVGVRRTDKGDLSCPDADPEGRFKARQANC</b>  | 611            |
| 10   | <b>CVHYEQPTIQIELRQNCCHHILIDLRHRPTAGAC</b> | 602            |
| 11   | VGVRRTDKGDLRLCDELVRTHHILIDLRH             | 601            |
| 12   | CAGAFNHSDLDAELRRCHHILIDLRHRPTAGAC         | 592            |
| 13   | <b>CSVGVRRTDKGDLRLCPDADPEGRFKARQANC</b>   | 585            |
| 14   | CVRPSEHALVDNDGLYCSVGVRRTDKGDLRLC          | 573            |
| 15   | CDAELRRLFRERYRLHCHSDLDAELRRLFRERC         | 566            |
| 16   | <b>CSVGVRRTDKGDLRLCNDGLYDPDADPEGRFC</b>   | 559            |
| 17   | <b>CVNSVGVRRTDKGDLSCGLYDPDADPEGRFKAC</b>  | 553            |
| 18   | CDLDAELRRLFRERYRCHSDLDAELRRLFRERC         | 534            |
| 19   | CDELVRTHHILIDLRHCHHILIDLRHRPTAGAC         | 534            |
| 20   | CAGAFNHSDLDAELRRCDLDAELRRLFRERYRC         | 529            |
| 21   | CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC         | 527            |
| 22   | CVHYEQPTIQIELRQNCDELDAELRRLFRERYRC        | 526            |
| 23   | CHHILIDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC         | 524            |
| 24   | CGVRRTDKGDLRLRADCVRRTDKGDLRLRADC          | 524            |
| 25   | CGLDLVRGEPQLQVERCHHILIDLRHRPTAGAC         | 521            |
| 26   | CDLDAELRRLFRERYRCDLVRTHHILIDLRHC          | 516            |

[Ejemplo 31]

5 [Secuenciación de regiones variables de genes de anticuerpo de anticuerpos anti-TROP-2 humano de ratón (clones K5-70, K5-107, K5-116-2-1, y T6-16)]

El ARN total se extrajo de  $3 \times 10^6$  hibridomas productores de anticuerpo monoclonal anti-TROP-2 de ratón, usando el reactivo TRIzol (Invitrogen). Con respecto al clon K5-70, el clon K5-107, y el clon K5-116-2-1, el ADNc se sintetizó usando el kit de Amplificación de ADNc de RACE SMARTer™ (Clontech) de acuerdo con el método incluido con el kit, usando un cebador específico de la cadena H de IgG de ratón (5'-TCCAKAGTT-3' (SEQ ID NO: 24)) y un cebador específico de la cadena L de IgG de ratón (5'-GCTGTCTGATC-3' (SEQ ID NO: 25)). Con respecto al clon T6-16, el ADNc se sintetizó usando el kit GeneRacer (Invitrogen) de acuerdo con el método incluido con el kit, usando un cebador oligo dT. Cada uno de los genes que codifican las regiones variables (VH, VL) de las cadenas H y L del clon K5-70 (IgG2a de ratón), el clon K5-107 (IgG1 de ratón) y el clon K5-116-2-1 (IgG2a de ratón) se clonaron con un método de PCR usando el ADNc sintetizado anteriormente como un molde. En esta operación, como cebador en la posición 5' se usó la Mezcla de Cebador A Universal 10 X (UPM) incluida con el kit de Amplificación de ADNc de RACE SMARTer™. Por otro lado, como cebador en la posición 3' para la amplificación de VH, se usó un cebador que tenía una secuencia específica para la cadena H de IgG de ratón, y como cebador en la posición 3' para la amplificación de VL, se usó un cebador que tenía una secuencia específica para la cadena L de IgG de ratón. Cebador en la posición 5' (Mezcla de Cebador A Universal 10 X (UPM)):

Largo (0,4  $\mu$ M)

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-

3' (SEQ ID NO: 26)

20

Corto (2  $\mu$ M)

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (SEQ ID NO: 27)

25 Cebador en la posición 3' (cebador R):

VH: 5'-GGGAARTARCCCTTGACCAGGCA-3' (SEQ ID NO: 28)

5'-GGGAARTAGCCTTTGACAAGGCA-3' (SEQ ID NO: 29)

VL: 5'-CACTGCCATCAATVTTCCTTGACA-3' (SEQ ID NO: 30)

30

Usando cada uno de los cebadores descritos anteriormente, la PCR se realizó con la composición de solución de reacción y condiciones de reacción que siguen a continuación. Además, un cebador R para amplificación del ADNc de VH se preparó mezclando las dos secuencias mencionadas anteriormente entre sí a una proporción equimolar y se usó a continuación.

35

<Composición de solución de reacción>

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| ADNc molde:                                   | 2,5 $\mu$ l                 |
| Tampón PrimeSTAR 5 X (Mg <sup>2+</sup> plus): | 10 $\mu$ l                  |
| dNTP 2,5 mM:                                  | 4 $\mu$ l                   |
| ADN polimerasa PrimeSTAR HS (2,5 U/ $\mu$ l): | 0,5 $\mu$ l                 |
| Mezcla de Cebador A Universal 10 X (UPM):     | 5 $\mu$ l                   |
| Cebador R (10 $\mu$ M):                       | 1 $\mu$ l                   |
| Agua esterilizada:                            | 27 $\mu$ l                  |
| <b>Total:</b>                                 | <b>50 <math>\mu</math>l</b> |

<Condiciones de reacción>

Una reacción se realizó a 94 °C (10 s), y a partir de ese momento, se realizó un ciclo que consistía en "desnaturalización/disociación con calor a 98 °C (10 s) → hibridación a 60 °C (5 s) → síntesis/elongación a 72 °C (60 s)" 30 veces en total. Por último, una reacción se realizó a 72 °C (3 min).

40

Los ADNc de VH y VL sintetizados se subclonaron en un vector pMD20-T (Takara Bio Inc.), y se determinaron las secuencias de nucleótidos de los mismos. Las secuencias de nucleótidos de una pluralidad de clones de VH y de clones de VL se descodificaron, y se identificaron secuencias de nucleótidos específicas para las regiones variables de la cadena H y de la cadena L de ratón. La Figura 33 y la Figura 34 muestran las secuencias de nucleótidos de ADNc consenso de la VH y VL de K5-70, y secuencias de aminoácidos supuestas. La Figura 35 y la Figura 36 muestran las secuencias de nucleótidos de ADNc consenso de la VH y VL de K5-107, y secuencias de aminoácidos supuestas. La Figura 37 and La Figura 38 muestran las secuencias de nucleótidos de ADNc consenso de la VH y VL de K5-116-2-1, y secuencias de aminoácidos supuestas.

50

Se clonaron genes que codifican las regiones variables (VH, VL) de las cadenas H y L del clon T6-16 con un método de PCR usando el ADNc sintetizado anteriormente como un molde. En esta operación, como cebador en la posición

5' se usó un cebador incluido con el kit GeneRacer. Por otro lado, como cebador en la posición 3' para la amplificación de VH, se usó un cebador que tenía una secuencia específica para la cadena H de IgG de ratón, y como cebador en la posición 3' para la amplificación de VL, se usó un cebador que tenía una secuencia específica para la cadena L de IgG de ratón.

5 Cebador en la posición 5' (cebador F):

5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3' (SEQ ID NO: 31)

10 Cebador en la posición 3' (cebador R):

VH: 5'- GCCAGTGGATAGACAGATGG-3' (SEQ ID NO: 32)

VL: 5'- GATGGATACAGTTGGTGCAGC-3' (SEQ ID NO: 33)

15 Usando cada uno de los cebadores descritos anteriormente, la PCR se realizó con la composición de solución de reacción y condiciones de reacción que siguen a continuación.

<Composición de solución de reacción>

|   |              |
|---|--------------|
| ADNc molde:                                   | 1,0 µl       |
| Tampón PrimeSTAR 5 X (Mg <sup>2+</sup> plus): | 10 µl        |
| dNTP 2,5 mM:                                  | 4 µl         |
| ADN polimerasa PrimeSTAR HS (2,5 U/µl):       | 0,5 µl       |
| Cebador F (10 µM):                            | 3 µl         |
| Cebador R (10 µM):                            | 1,0 µl       |
| Agua esterilizada:                            | 30,5 µl      |
| <b>Total:</b>                                 | <b>50 µl</b> |

20 <Condiciones de reacción>

Una reacción realizó a 94 °C (10 s), y a partir de ese momento, Un ciclo que consistía en "desnaturalización/disociación con calor a 98 °C (10 s) → hibridación a 57 °C (10 s) → síntesis/elongación a 72 °C (60 s)" se realizó 35 veces en total.

25 Los ADNc de VH y VL sintetizados se subclonaron en un vector pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen), y se determinaron las secuencias de nucleótidos de los mismos. Las secuencias de nucleótidos de una pluralidad de clones de VH y de clones de VL se descodificaron, y se identificaron secuencias de nucleótidos específicas para las regiones variables de la cadena H y de la cadena L de ratón. La Figura 39 y la Figura 40 s muestran las secuencias de nucleótidos de  
30 ADNc consenso de la VH y VL de T6-16, y secuencias de aminoácidos supuestas.

**Aplicabilidad industrial**

35 La presente invención es capaz de proporcionar un anticuerpo, que reacciona de forma específica con hTROP-2 y que tiene actividad antitumoral *in vivo* elevada, y en particular, un anticuerpo monoclonal que tiene actividad antitumoral *in vivo* elevada a una dosis baja. Además, la presente invención es capaz de proporcionar un hibridoma, que produce el anticuerpo, un fragmento del anticuerpo, un complejo del anticuerpo o similares y diversos tipos de fármacos, una composición farmacéutica para diagnosticar o tratar un tumor, un método para detectar un tumor, y un  
40 kit para detectar o diagnosticar un tumor.

[Listado de Secuencias Sin Texto]

|               |               |
|---------------|---------------|
| SEQ ID NO: 3  | ADN Sintético |
| SEQ ID NO: 4  | ADN Sintético |
| SEQ ID NO: 5  | ADN Sintético |
| SEQ ID NO: 6  | ADN Sintético |
| SEQ ID NO: 7  | ADN Sintético |
| SEQ ID NO: 8  | ADN Sintético |
| SEQ ID NO: 9  | ADN Sintético |
| SEQ ID NO: 10 | ADN Sintético |
| SEQ ID NO: 11 | ADN Sintético |
| SEQ ID NO: 12 | ADN Sintético |
| SEQ ID NO: 13 | ADN Sintético |
| SEQ ID NO: 14 | ADN Sintético |

[Listado de Secuencias Sin Texto]

SEQ ID NO: 15      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 16      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 17      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 18      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 19      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 20      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 21      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 22      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 23      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 24      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 25      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 26      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 27      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 28      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 29      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 30      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 31      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 32      ADN Sintético  
 SEQ ID NO: 33      ADN Sintético

**Listado de secuencias**

<110> LivTech, Inc.

5      <120> anticuerpo anti-hTROP-2

<130> PCT11-0004

<150> JP 2010-113302

10      <151> 2010-05-17

<160> 73

<170> PatentIn versión 3.4

15      <210> 1  
 <211> 2080  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

20      <220>  
 <221> CDS  
 <222> (339)..(1310)

25      <400> 1



ES 2 664 809 T3

|  |                         |
|--|-------------------------|
| gcgggtcccc agaagcctac aggtgagtat cggttctccc cttcccggct ttcggtcgg   | 60                      |
| aggaggcggg agcagcttcc ctgttctgat cctatcgcgg gcggcgcagg gccggcttgg  | 120                     |
| ccttccgtgg gacggggagg gggcgggat gtgtcaccca aataccagtg gggacggtcg   | 180                     |
| gtggtggaac cagccggcca gctcggtag agtataagag cgggaggag cggccggcg     | 240                     |
| gcagacgcct gcagaccatc ccagacgccg gagccccgagc cccgacgagt ccccgcgcct | 300                     |
| catccgcccg cgtccggctc gcgttctctc gccccacc atg gct cgg ggc ccc ggc  | 356                     |
|  | Met Ala Arg Gly Pro Gly |
|  | 1 5                     |
| ctc gcg ccg cca ccg ctg cgg ctg ccg ctg ctg ctg ctg gtg ctg gcg    | 404                     |
| Leu Ala Pro Pro Pro Leu Arg Leu Pro Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala    |                         |
|  | 10 15 20                |
| gcg gtg acc ggc cac acg gcc gcg cag gac aac tgc acg tgt ccc acc    | 452                     |
| Ala Val Thr Gly His Thr Ala Ala Gln Asp Asn Cys Thr Cys Pro Thr    |                         |
|  | 25 30 35                |
| aac aag atg acc gtg tgc agc ccc gac ggc ccc ggc ggc cgc tgc cag    | 500                     |
| Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln    |                         |
|  | 40 45 50                |

ES 2 664 809 T3

|   |      |
|---|------|
| tgc cgc gcg ctg ggc tcg ggc atg gcg gtc gac tgc tcc acg ctg acc | 548  |
| Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr |      |
| 55 60 65 70   |      |
| tcc aag tgt ctg ctg ctc aag gcg cgc atg agc gcc ccc aag aac gcc | 596  |
| Ser Lys Cys Leu Leu Leu Lys Ala Arg Met Ser Ala Pro Lys Asn Ala |      |
| 75 80 85  |      |
| cgc acg ctg gtg cgg ccg agt gag cac gcg ctc gtg gac aac gat ggc | 644  |
| Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala Leu Val Asp Asn Asp Gly |      |
| 90 95 100   |      |
| ctc tac gac ccc gac tgc gac ccc gag ggc cgc ttc aag gcg cgc cag | 692  |
| Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln |      |
| 105 110 115   |      |
| tgc aac cag acg tcg gtg tgc tgg tgc gtg aac tcg gtg ggc gtg cgc | 740  |
| Cys Asn Gln Thr Ser Val Cys Trp Cys Val Asn Ser Val Gly Val Arg |      |
| 120 125 130   |      |
| cgc acg gac aag ggc gac ctg agc cta cgc tgc gat gag ctg gtg cgc | 788  |
| Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg Cys Asp Glu Leu Val Arg |      |
| 135 140 145 150   |      |
| acc cac cac atc ctc att gac ctg cgc cac cgc ccc acc gcc ggc gcc | 836  |
| Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala |      |
| 155 160 165   |      |
| ttc aac cac tca gac ctg gac gcc gag ctg agg cgg ctc ttc cgc gag | 884  |
| Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu |      |
| 170 175 180   |      |
| cgc tat cgg ctg cac ccc aag ttc gtg gcg gcc gtg cac tac gag cag | 932  |
| Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys Phe Val Ala Ala Val His Tyr Glu Gln |      |
| 185 190 195   |      |
| ccc acc atc cag atc gag ctg cgg cag aac acg tct cag aag gcc gcc | 980  |
| Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn Thr Ser Gln Lys Ala Ala |      |
| 200 205 210   |      |
| ggt gac gtg gat atc ggc gat gcc gcc tac tac ttc gag agg gac atc | 1028 |
| Gly Asp Val Asp Ile Gly Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Glu Arg Asp Ile |      |
| 215 220 225 230   |      |
| aag ggc gag tct cta ttc cag ggc cgc ggc gcc ctg gac ttg cgc gtg | 1076 |
| Lys Gly Glu Ser Leu Phe Gln Gly Arg Gly Gly Leu Asp Leu Arg Val |      |
| 235 240 245   |      |
| cgc gga gaa ccc ctg cag gtg gag cgc acg ctc atc tat tac ctg gac | 1124 |
| Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg Thr Leu Ile Tyr Tyr Leu Asp |      |

ES 2 664 809 T3

| 250  | 255 | 260 |      |
|--|-----|-----|------|
| gag att ccc ccg aag ttc tcc atg aag cgc ctc acc gcc ggc ctc atc    |     |     | 1172 |
| Glu Ile Pro Pro Lys Phe Ser Met Lys Arg Leu Thr Ala Gly Leu Ile    |     |     |      |
| 265  | 270 | 275 |      |
| gcc gtc atc gtg gtg gtc gtg gtg gcc ctc gtc gcc ggc atg gcc gtc    |     |     | 1220 |
| Ala Val Ile Val Val Val Val Val Ala Leu Val Ala Gly Met Ala Val    |     |     |      |
| 280  | 285 | 290 |      |
| ctg gtg atc acc aac cgg aga aag tcg ggg aag tac aag aag gtg gag    |     |     | 1268 |
| Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser Gly Lys Tyr Lys Lys Val Glu    |     |     |      |
| 295  | 300 | 305 | 310  |
| atc aag gaa ctg ggg gag ttg aga aag gaa ccg agc ttg tag            |     |     | 1310 |
| Ile Lys Glu Leu Gly Glu Leu Arg Lys Glu Pro Ser Leu                |     |     |      |
| 315  | 320 |     |      |
| gtaccggcg gggcagggga tggggtgggg taccggattt cggtatcgtc ccagaccxaa   |     |     | 1370 |
| gtgagtcacg cttcctgatt cctcggcgca aaggagacgt ttatcctttc aaattcctgc  |     |     | 1430 |
| cttccccctc ccttttgcgc acacaccagg tttaatagat cctggcctca gggctctcctt |     |     | 1490 |
| tctttctcac ttctgtcttg aaggaagcat ttctaaaatg tatccccttt cggccaaca   |     |     | 1550 |
| acaggaaacc tgactggggc agtgaaggaa gggatggcat agcgttatgt gtaaaaaaca  |     |     | 1610 |
| agtatctgta tgacaaccg ggatcgtttg caagtaactg aatccattgc gacattgtga   |     |     | 1670 |
| aggcttaaat gagtttagat gggaaatagc gttgttatcg ccttggggtt aaattatttg  |     |     | 1730 |
| atgagttcca cttgtatcat ggcctaccg aggagaagag gagtttgta actggccta     |     |     | 1790 |
| tgtagtagcc tcatttacca tcgtttgtat tactgaccac atatgcttgt cactgggaaa  |     |     | 1850 |
| gaagcctggt tcagctgcct gaacgcagtt tggatgtctt tgaggacaga cattgcccgg  |     |     | 1910 |
| aaactcagtc tatttattct tcagcttgcc cttactgcc a ctgatattgg taatgttctt |     |     | 1970 |
| ttttgtaaaa tgtttgtaca tatgtgtct ttgataatgt tgctgtaatt ttttaaaata   |     |     | 2030 |
| aaacacgaat ttaataaaat atgggaaagg cacaaaccag aaaaaaaaaa             |     |     | 2080 |

<210> 2  
 <211> 323  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 2

5

ES 2 664 809 T3

Met Ala Arg Gly Pro Gly Leu Ala Pro Pro Pro Leu Arg Leu Pro Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Val Leu Ala Ala Val Thr Gly His Thr Ala Ala Gln Asp  
 20 25 30

Asn Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly  
 35 40 45

Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val  
 50 55 60

Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys Cys Leu Leu Leu Lys Ala Arg Met  
 65 70 75 80

Ser Ala Pro Lys Asn Ala Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala  
 85 90 95

Leu Val Asp Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly  
 100 105 110

Arg Phe Lys Ala Arg Gln Cys Asn Gln Thr Ser Val Cys Trp Cys Val  
 115 120 125

Asn Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg  
 130 135 140

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His  
 145 150 155 160

Arg Pro Thr Ala Gly Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu  
 165 170 175

Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys Phe Val Ala  
 180 185 190

Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn  
 195 200 205

Thr Ser Gln Lys Ala Ala Gly Asp Val Asp Ile Gly Asp Ala Ala Tyr  
 210 215 220

Tyr Phe Glu Arg Asp Ile Lys Gly Glu Ser Leu Phe Gln Gly Arg Gly  
 225 230 235 240

Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg Thr  
 245 250 255

Leu Ile Tyr Tyr Leu Asp Glu Ile Pro Pro Lys Phe Ser Met Lys Arg  
 260 265 270

Leu Thr Ala Gly Leu Ile Ala Val Ile Val Val Val Val Val Ala Leu  
 275 280 285

Val Ala Gly Met Ala Val Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser Gly  
 290 295 300

Lys Tyr Lys Lys Val Glu Ile Lys Glu Leu Gly Glu Leu Arg Lys Glu  
 305 310 315 320

Pro Ser Leu

5 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> ADN sintético

<400> 3  
 ttctccgcc ccaccatggc 20

15 <210> 4  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> ADN sintético

<400> 4  
 ctcgagcaag ctcggttct ttctc 25

25 <210> 5

<211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> ADN sintético

<400> 5  
 ctcgagctcg tccagtaat agatgagcg 29

10 <210> 6  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> ADN sintético

20 <400> 6  
 gatccactag tcgcgagtgg tgg 23

25 <210> 7  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADN sintético

30 <400> 7  
 aattccacca ctgctgacta gtg 23

35 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> ADN sintético

<400> 8  
 tcctcgtgtc ccactcccgg 20

45 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> ADN sintético

<400> 9  
 ctcgagtgca ttgagttccc tatgc 25

55 <210> 10  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADN sintético

5 <400> 10  
 cctgagccta cgctgcgacg aagtgggtgcg 30

10 <210> 11  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> ADN sintético

<400> 11  
 cgcaccactt cgctgcgacg taggctcagg 30

20 <210> 12  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> ADN sintético

<400> 12  
 gactgctcca cgctgacttc caagtgcctg 30

30 <210> 13  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> ADN sintético

<400> 13  
 caggcacttg gaagtcagcg tggagcagtc 30

40 <210> 14  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> ADN sintético

50 <400> 14  
 ctcgtggaca acgatggcct ctacgacccg 30

55 <210> 15  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADN sintético

<400> 15

cgggctgtag aggccatcgt tgtccacgag 30  
 <210> 16  
 <211> 31  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 10  
 <400> 16  
 ccaaagcctg cgctgcatg agctggcg c 31  
 <210> 17  
 15 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> ADN sintético  
 <400> 17  
 ggcaccagc tcatcgagc gcaggcttg g 31  
 25 <210> 18  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <400> 18  
 35 agcttctat ccgcggtgca ctacgagcag 30  
 <210> 19  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <400> 19  
 45 ctgctcgtag tgaccgcgg ataggaagct 30  
 <210> 20  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 55 <400> 20  
 gacattaaag gcgagtctct attccagggc 30  
 <210> 21  
 <211> 30



<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> ADN sintético  
  
 <400> 21  
 gccctggaat agagactcgc cttaatgctc 30  
  
 10 <210> 22  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> ADN sintético  
  
 <400> 22  
 20 ctactccacc ccaccctggc g 21  
  
 <210> 23  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
  
 <400> 23  
 30 ctcgagcaag ctaggtcgc ttctc 25  
  
 <210> 24  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
  
 <400> 24  
 40 tccakagtt 9  
  
 <210> 25  
 <211> 12  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 50  
 <400> 25  
 gctgtcctga tc 12  
  
 55 <210> 26  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>

|    |   |    |    |
|----|---|----|----|
|    | <223> ADN sintético                               |    |    |
|    | <400> 26  |    |    |
| 5  | ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt |    | 45 |
|    | <210> 27  |    |    |
|    | <211> 22  |    |    |
|    | <212> ADN   |    |    |
| 10 | <213> Artificial                                  |    |    |
|    | <220>   |    |    |
|    | <223> ADN sintético                               |    |    |
|    | <400> 27  |    |    |
| 15 | ctaatacgac tcactatagg gc                          | 22 |    |
|    | <210> 28  |    |    |
|    | <211> 23  |    |    |
|    | <212> ADN   |    |    |
| 20 | <213> Artificial                                  |    |    |
|    | <220>   |    |    |
|    | <223> ADN sintético                               |    |    |
|    | <400> 28  |    |    |
| 25 | gggaartarc ccttgaccag gca                         | 23 |    |
|    | <210> 29  |    |    |
|    | <211> 23  |    |    |
| 30 | <212> ADN   |    |    |
|    | <213> Artificial                                  |    |    |
|    | <220>   |    |    |
|    | <223> ADN sintético                               |    |    |
| 35 | <400> 29  |    |    |
|    | gggaartagc cttgacaag gca                          | 23 |    |
|    | <210> 30  |    |    |
| 40 | <211> 26  |    |    |
|    | <212> ADN   |    |    |
|    | <213> Artificial                                  |    |    |
|    | <220>   |    |    |
| 45 | <223> ADN sintético                               |    |    |
|    | <400> 30  |    |    |
|    | cactgccatc aatvtccac tgaca                        | 26 |    |
| 50 | <210> 31  |    |    |
|    | <211> 23  |    |    |
|    | <212> ADN   |    |    |
|    | <213> Artificial                                  |    |    |
| 55 | <220>   |    |    |
|    | <223> ADN sintético                               |    |    |
|    | <400> 31  |    |    |
|    | cgactggagc acgaggacac tga                         | 23 |    |

<210> 32  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
  
 10 <400> 32  
 gccagtggat agacagatgg 20  
  
 <210> 33  
 <211> 21  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 20  
 <400> 33  
 gatggataca gttggtgcag c 21  
  
 <210> 34  
 <211> 402  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <220>  
 30 <221> CDS  
 <222> (1)..(402)  
  
 <400> 34

ES 2 664 809 T3

|   |     |
|---|-----|
| atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt | 48  |
| Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly |     |
| 1 5 10 15   |     |
| gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg agg | 96  |
| Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg |     |
| 20 25 30  |     |
| cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc | 144 |
| Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe |     |
| 35 40 45  |     |
| acc atc tac tgg ata aac tgg gtg aaa cag agg cct gga caa ggc ctt | 192 |
| Thr Ile Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu |     |
| 50 55 60  |     |
| gag tgg atc gga aat att tat cct tct gat agt tat act aac tac aat | 240 |
| Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn |     |
| 65 70 75 80   |     |
| caa aag ttc aag gac aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc | 288 |
| Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser |     |
| 85 90 95  |     |
| aca gcc tac atg cag ctc agc agc ccg aca tct gag gac tct gcg gtc | 336 |
| Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val |     |
| 100 105 110   |     |
| tat tac tgt aca aga acg tct atg gcg gac tac tgg ggc caa ggc acc | 384 |
| Tyr Tyr Cys Thr Arg Thr Ser Met Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr |     |
| 115 120 125   |     |
| act ctc aca gtc tcc tca   | 402 |
| Thr Leu Thr Val Ser Ser   |     |
| 130   |     |

<210> 35

<211> 134

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

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

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

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Thr Ser Met Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 130

5 <210> 36  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

10 Ile Tyr Trp Ile Asn  
 1 5

15 <210> 37  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 37

ES 2 664 809 T3

Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Asp

<210> 38  
 <211> 6

5

<210> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

10

Thr Ser Met Ala Asp Tyr  
 1 5

<210> 39  
 <211> 381

15

<210> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(381)

20

<400> 39

atg gta tcc aca cct cag ttc ctt gta ttt ttg ctt ttc tgg att cca 48  
 Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro  
 1 5 10 15

gcc tcc aga ggt gac atc ttg ctg act cag tct cca gcc atc ctg tct 96  
 Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser  
 20 25 30

gtg agt cca gga gaa aga gtc agt ttc tcc tgc agg gcc agt cag agc 144  
 Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 35 40 45

att ggc aca agc ata cac tgg tat cag caa aga aca aat ggt tct cca 192  
 Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro  
 50 55 60

25

ES 2 664 809 T3

agg ctt ctc ata aag tat gct tct gag tct atc tct ggg atc cct tcc 240  
 Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser  
 65 70 75 80

agg ttt agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttt act ctt agc atc aac 288  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn  
 85 90 95

agt gtg gag tct gaa gat att gca gat tat tac tgt caa caa agt aat 336  
 Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn  
 100 105 110

agc tgg cca ttc acg ttc ggc tgc ggg aca aag ttg gaa ata aaa 381  
 Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

<210> 40  
 <211> 127

5

<210> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

10

Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro  
 1 5 10 15

Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser  
 20 25 30

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

Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro  
 50 55 60

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

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

Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn  
 100 105 110

ES 2 664 809 T3

Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

5 <210> 41  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 41

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His  
 1 5 10

10 <210> 42  
 <211> 7  
 15 <210> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 42

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser  
 1 5

20 <210> 43  
 <211> 9  
 25 <210> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 43

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr  
 1 5

30 <210> 44  
 <211> 402  
 <212> ADN  
 35 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).. (402)  
 40 <400> 44

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly



ES 2 664 809 T3

|   |     |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|
| 1   | 5   | 10  | 15  |     |
| gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag caa cct ggg tct gag ctg gtg agg |     |     |     | 96  |
| Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg |     |     |     |     |
|   | 20  | 25  | 30  |     |
| cct gga gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttc |     |     |     | 144 |
| Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe |     |     |     |     |
|   | 35  | 40  | 45  |     |
| acc agc tac tgg atg cac tgg gtg aag cag agg cat gga caa ggc ctt |     |     |     | 192 |
| Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg His Gly Gln Gly Leu |     |     |     |     |
|   | 50  | 55  | 60  |     |
| gag tgg att gga aat att tat cct ggt ggt ggt tat act aac tac gat |     |     |     | 240 |
| Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asp |     |     |     |     |
|   | 65  | 70  | 75  | 80  |
| gag aag ttc aag agc aag ggc aca ctg act gta gac aca tcc tcc agc |     |     |     | 288 |
| Glu Lys Phe Lys Ser Lys Gly Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser |     |     |     |     |
|   | 85  | 90  | 95  |     |
| aca gcc tac atg cac ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc |     |     |     | 336 |
| Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val |     |     |     |     |
|   | 100 | 105 | 110 |     |
| tat tac tgt aca aga tca tcc gtt ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc |     |     |     | 384 |
| Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Ser Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr |     |     |     |     |
|   | 115 | 120 | 125 |     |
| act ctc aca gtc tcc tca   |     |     |     | 402 |
| Thr Leu Thr Val Ser Ser   |     |     |     |     |
|   | 130 |     |     |     |

- <210> 45
- <211> 134
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 45

|   |    |    |    |  |
|---|----|----|----|--|
| Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly |    |    |    |  |
| 1   | 5  | 10 | 15 |  |
| Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg |    |    |    |  |
|   | 20 | 25 | 30 |  |
| Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe |    |    |    |  |



ES 2 664 809 T3

<212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 48

5

Ser Ser Val Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 49

10

<210> 381  
 <212> ADN

<210> *Homo sapiens*

15

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(381)

20

<400> 49

|   |     |
|---|-----|
| atg gta tcc aca cct cag ttc ctt gta ttt ttg ctt ttc tgg att cca | 48  |
| Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro |     |
| 1 5 10 15   |     |
| gcc tcc aga ggt gac atc ttg ctg act cag tct cca gcc atc ctg tct | 96  |
| Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser |     |
| 20 25 30  |     |
| gtg agt cca gga gaa aga gtc agt ttc tcc tgc agg gcc agt cag aac | 144 |
| Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn |     |
| 35 40 45  |     |
| att ggc aca agc ata cac tgg ttt cag caa aga aca aat ggt tct cca | 192 |
| Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Phe Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro |     |
| 50 55 60  |     |
| agg ctt ctc ata aag tat gct tct gag tct atc tct ggg atc cct tcc | 240 |
| Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser |     |
| 65 70 75 80   |     |
| agg ttt agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttt act ctt agc atc aac | 288 |
| Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn |     |
| 85 90 95  |     |
| agt gtg gag tct gaa gat att gca gat tat tac tgt caa caa agt aat | 336 |
| Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn |     |
| 100 105 110   |     |
| agc tgg cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa     | 381 |
| Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys     |     |
| 115 120 125   |     |

<210> 50  
 <211> 127

5 <210> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 50

Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro  
 1 5 10 15

Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser  
 20 25 30

Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn  
 35 40 45

Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Phe Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro  
 50 55 60

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

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

Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn  
 100 105 110

Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

10

<210> 51  
 <211> 11

15 <210> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 51

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Ser Ile His  
 1 5 10

20

<210> 52

ES 2 664 809 T3

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

5  
 <400> 52

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser  
 1 5

10  
 <210> 53  
 <210> 9

<210> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr  
 1 5

20  
 <210> 54  
 <211> 396

<210> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).. (396)

30  
 <400> 54

|   |     |
|---|-----|
| atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt | 48  |
| Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly |     |
| 1 5 10 15   |     |
| gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg agg | 96  |
| Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg |     |
| 20 25 30  |     |
| cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc | 144 |
| Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe |     |
| 35 40 45  |     |
| acc agc tac tgg ata acc tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt | 192 |

ES 2 664 809 T3

|   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|-----|
| Thr   | Ser | Tyr | Trp | Ile | Thr | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu |  |     |
| 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |     |
| gag tgg atc gga aat att tat cct tct gat agt tat act aac tac aat |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |
| Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  | 240 |
| caa aag ttc agg gac aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agt |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |
| Gln Lys Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |
|   |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  | 288 |
| aca gcc tac atg cag ctc agc agc ccg aca tct gag gac tct gcg gtc |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |
| Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |
|   |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  | 336 |
| tat tac tgt tca gcc ctc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |
| Tyr Tyr Cys Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |
|   |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |  | 384 |
| aca gtc tcc tca   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |
| Thr Val Ser Ser   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |
|   |     | 130 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  | 396 |

<210> 55

<211> 132

5

<210> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 55

10

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

ES 2 664 809 T3

Gln Lys Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
115 120 125

Thr Val Ser Ser  
130

<210> 56  
<211> 5

5

<210> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 56

10

Ser Tyr Trp Ile Thr  
1 5

<210> 57  
<211> 17

15

<210> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 57

20

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

Asp

<210> 58

25

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

<400> 58

30

Leu Phe Asp Tyr  
1

<210> 59  
<211> 381

ES 2 664 809 T3

<212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(381)

<400> 59

|   |     |
|---|-----|
| atg gta tcc aca cct cag ttc ctt gta ttt ttg ctt ttc tgg att cca | 48  |
| Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro |     |
| 1 5 10 15   |     |
| gcc tcc aga ggt gac atc ttg ctg act cag tct cca gcc atc ctg tct | 96  |
| Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser |     |
| 20 25 30  |     |
| gtg agt cca gga gaa aga gtc agt ttc tcc tgc agg gcc agt cag agc | 144 |
| Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser |     |
| 35 40 45  |     |
| att ggc aca agc ata cac tgg tat cag caa aga aca aat ggt tct cca | 192 |
| Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro |     |
| 50 55 60  |     |
| agg ctt ctc ata aag tat gct tct gag tct atc tct ggg atc cct tcc | 240 |
| Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser |     |
| 65 70 75 80   |     |
| agg ttt agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttt att ctt agc atc aac | 288 |
| Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Ser Ile Asn |     |
| 85 90 95  |     |
| agt gtg gag tct gaa gat att gca gat tat tac tgt caa caa agt aat | 336 |
| Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn |     |
| 100 105 110   |     |
| agc tgg cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa     | 381 |
| Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys     |     |
| 115 120 125   |     |

10

<210> 60  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 60



ES 2 664 809 T3

Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro  
 1 5 10 15

Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser  
 20 25 30

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

Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro  
 50 55 60

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

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

Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn  
 100 105 110

Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

<210> 61  
 <211> 11  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 61

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His  
 1 5 10

10 <210> 62  
 <211> 7

15 <210> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 62

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser  
 1 5

20

<210> 63  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 63

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr  
 1 5

10 <210> 64  
 <211> 423  
 <212> ADN

15 <210> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(423)

20 <400> 64

atg gga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggc 48  
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
 1 5 10 15

gtc cac tct gag gtc cag ctt cag cag tca gga cct gag ctg gtg aaa 96  
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
 20 25 30

cct ggg gcc tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct gga tac aca ttc 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

act gac tac aat atg cac tgg gtg aag cag agc cat gga aag aac ctt 192  
 Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu  
 50 55 60

gaa tgg att gga tat att tat cct tac aat ggt ggt act ggc tac aac 240  
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn  
 65 70 75 80

cag agg ttc aag agc agg gcc aca atg act gta gac aaa tcc tcc agc 288  
 Gln Arg Phe Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

aca gcc tac atg gag ctc cgc agc ctg aca tct gat gac tct gca gtc 336  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

tat tac tgt gca aga gaa gac tac ggt agt agc ccc tct tat gct atg 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Ala Met  
 115 120 125

gac tat tgg ggt caa gga acc tca gtc atc gtc tcc tca 423  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser  
 130 135 140

<210> 65  
 <211> 141

5

<210> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 65

10

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn  
 65 70 75 80

Gln Arg Phe Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Ala Met  
 115 120 125

ES 2 664 809 T3

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser  
 130 135 140

5 <210> 66  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 66

Asp Tyr Asn Met His  
 1 5

10 <210> 67  
 <211> 17  
 15 <210> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 67

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Arg Phe Lys  
 1 5 10 15

20 Ser  
 <210> 68  
 <211> 13  
 25 <210> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 68

Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

30 <210> 69  
 <211> 390  
 <212> ADN  
 35 <213> *Homo sapiens*  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(390)  
 40 <400> 69





ES 2 664 809 T3

<210> 73  
<211> 8  
<212> PRT  
5 <213> *Homo sapiens*  
  
<400> 73

10 Ser Gln Thr Thr His Val Pro Thr  
1 5

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo contra TROP-2 humano, que tiene actividad antitumoral *in vivo* y en el que:

- 5 (a) la región V de la cadena H del anticuerpo consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 35 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 20 a 134 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 35, y la región V de la cadena L de la misma consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 40 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 21 a 127 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 40; o
- 10 (b) la región V de la cadena H del anticuerpo consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 65 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 20 a 141 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 65, y la región V de la cadena L de la misma consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 70 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 20 a 130 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 70.

2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde:

- 20 (a) el anticuerpo tiene actividad antitumoral en dos o más tipos de líneas de células tumorales humanas, donde las líneas de células tumorales son de al menos dos tipos seleccionados del grupo que consiste en una línea de células de cáncer pancreático humano PK-59, una línea de células de cáncer pancreático humano BxPC-3, una línea de células de cáncer pancreático humano KP-3L, una línea de células de cáncer pancreático humano KP-2, una línea de células de cáncer pancreático humano PK-1, una línea de células de cáncer pancreático humano PK-45H, una línea de células de cáncer pancreático humano PK-45P, una línea de células de cáncer pancreático humano TCC-PAN2, una línea de células de cáncer pancreático humano SUIT-2, una línea de células de cáncer de colon humano CACO-2, una línea de células de cáncer de colon humano SW480, una línea de células de cáncer de colon humano DLD-1, una línea de células de cáncer de colon humano HCT 116, una línea de células de cáncer de mama humano JIMT-1, una línea de células de cáncer de mama humano HCC1143, una línea de células de cáncer de mama humano MCF-7, una línea de células de cáncer de próstata humano DU145 y una línea de células de cáncer de próstata humano PC-3; y preferentemente son la línea de células de cáncer pancreático humano PK-59 y la línea de células de cáncer pancreático humano BxPC-3; y/o
- 25 (c) el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal; y/o
- 30 (d) el tumor es al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano; y preferentemente es cáncer pancreático humano; y/o
- 35 (e) el tumor es un cáncer recurrente o un cáncer metastásico.

3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el anticuerpo es un anticuerpo genéticamente recombinante, que es preferentemente un anticuerpo quimérico.

4. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une:

- 45 (a) a un sitio al que se une el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma que tiene el N.º de registro FERM BP-11251 o FERM BP-11346; o
- 50 (b) a una porción que comprende al menos una región seleccionada del grupo que consiste en una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 43 a 65, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 152 a 165, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 171 a 183, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 109 a 120, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 43 a 56, y una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 193 a 206, en la secuencia de aminoácidos de TROP-2 humano mostrada en la SEQ ID NO: 2.

5. Un anticuerpo monoclonal contra TROP-2 humano, que se produce por un hibridoma que tiene el N.º de registro FERM BP-11251, o FERM BP-11346.

55 6. Un fragmento de anticuerpo obtenido a partir de un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:

- 60 (a) la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H mostrada en la SEQ ID NO: 35 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 20 a 134 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 35, y la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L mostrada en la SEQ ID NO: 40 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 21 a 127 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 40; o
- 65 (b) la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H mostrada en la SEQ ID NO: 65 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 20 a 141 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 65, y la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L mostrada en la SEQ



ID NO: 70 o la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 20 a 130 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 70.

- 5 7. Un hibridoma que produce un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o que tiene el N.º de registro FERM BP-11251 o FERM BP-11346.
- 10 8. Un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un fragmento de anticuerpo como se define en la reivindicación 6, y una sustancia que tiene actividad antitumoral y/o actividad de eliminación de células.
- 15 9. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 8, donde:  
(a) el tumor es al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano; o  
(b) el tumor es cáncer pancreático humano; y/o  
(c) el tumor es un cáncer recurrente o un cáncer metastásico.
- 20 10. Una composición farmacéutica que comprende al menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un fragmento de anticuerpo como se define en la reivindicación 6 o un conjugado como se define en la reivindicación 8 o 9.
- 25 11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para uso en un método para tratar un tumor, opcionalmente donde el método para tratar un tumor no produce una reducción del peso como efecto secundario.
- 30 12. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde:  
(a) el tumor es al menos un tipo seleccionado de entre el grupo que consiste en cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano; y/o  
(b) el tumor es un cáncer recurrente o un cáncer metastásico.
- 35 13. Un método para detectar un tumor, que comprende:  
- permitir que al menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un fragmento de anticuerpo como se define en la reivindicación 7 u 8 y un conjugado como se define en la reivindicación 10, reaccione con una muestra que se ha recogido de un organismo vivo; y  
- a continuación detectar una señal(s) del anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo que se ha hecho reaccionar.
- 40 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, donde el tumor es al menos un tipo seleccionado de entre el grupo que consiste en cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano.
- 45 15. Un kit para tratar, diagnosticar o detectar un tumor, que comprende al menos uno seleccionado de entre el grupo que consiste en un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un fragmento de anticuerpo como se define en la reivindicación 6 y un conjugado de acuerdo con la reivindicación 7 u 8; opcionalmente donde el tumor es al menos un tipo seleccionado de entre el grupo que consiste en cáncer pancreático humano, cáncer de próstata humano, cáncer de colon humano y cáncer de mama humano.

Fig. 1

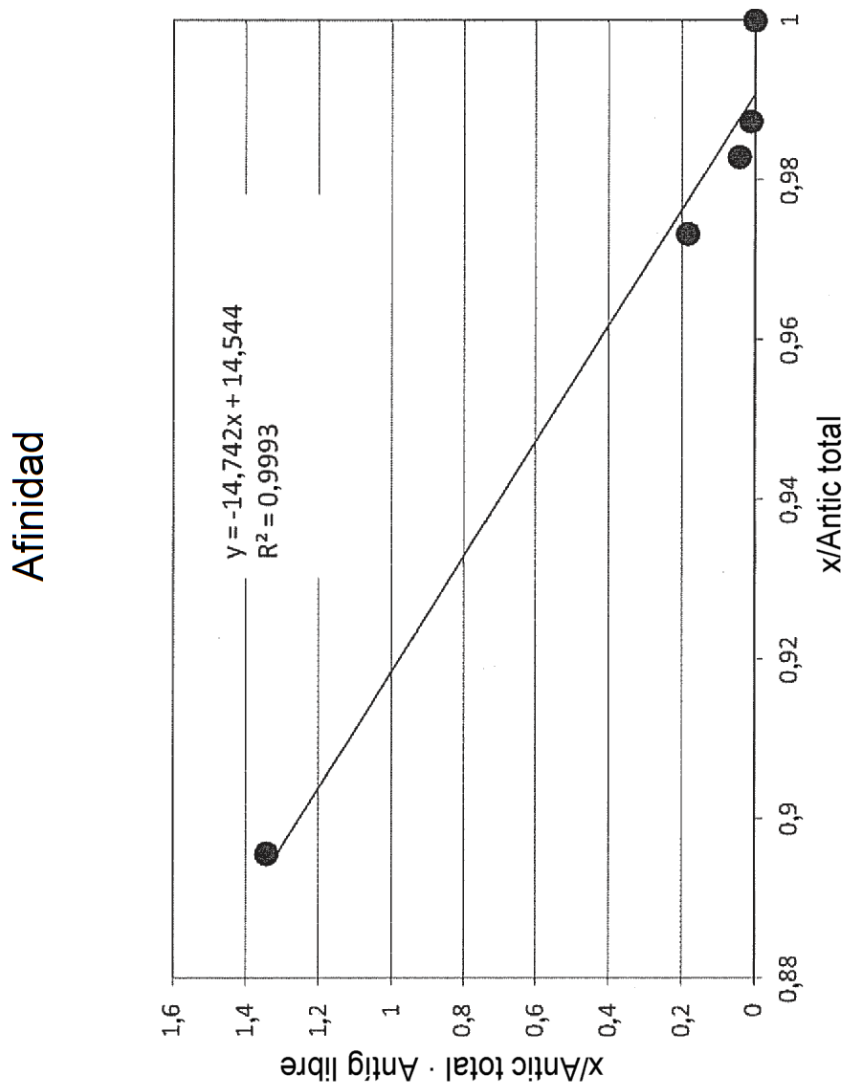


Fig. 2

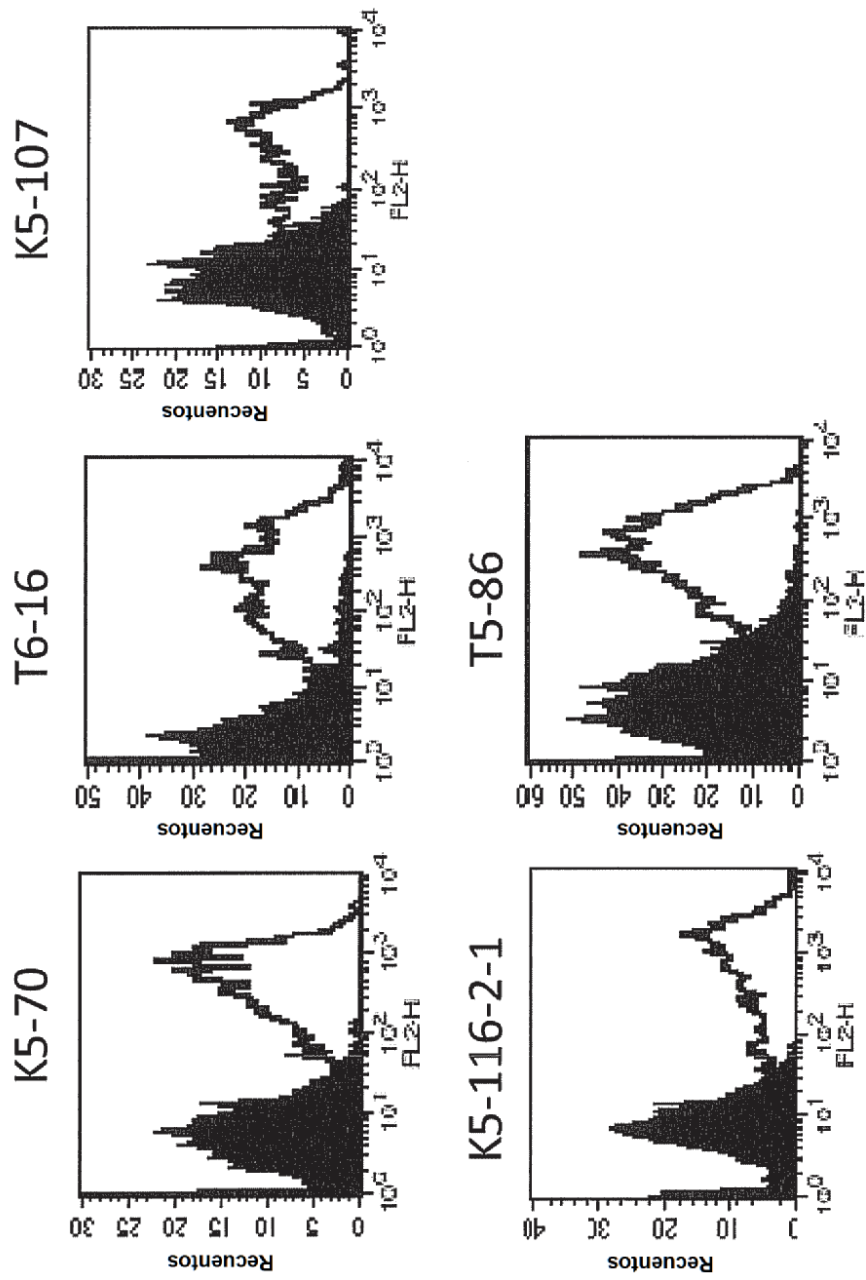


Fig. 3

PK-59

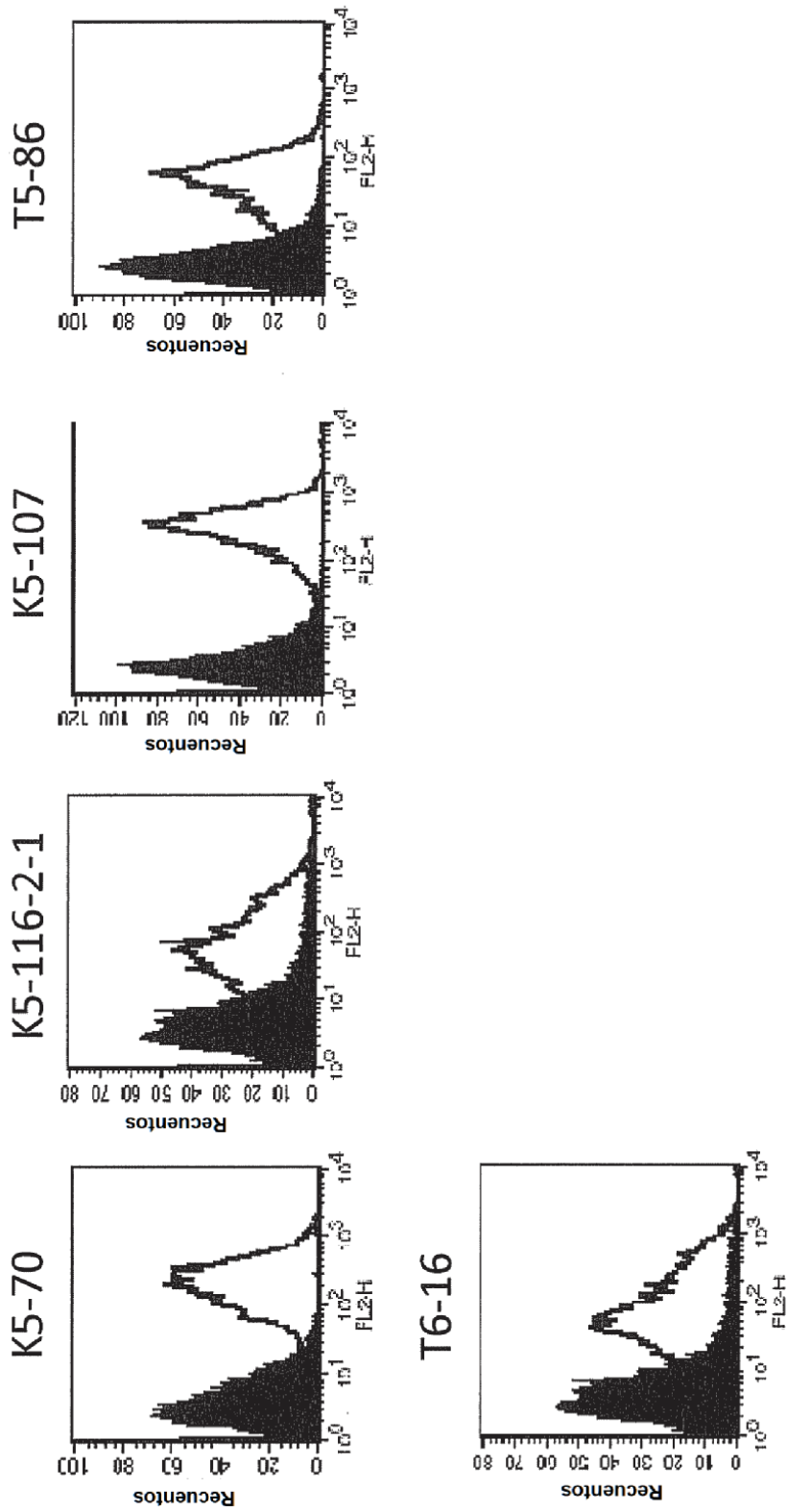
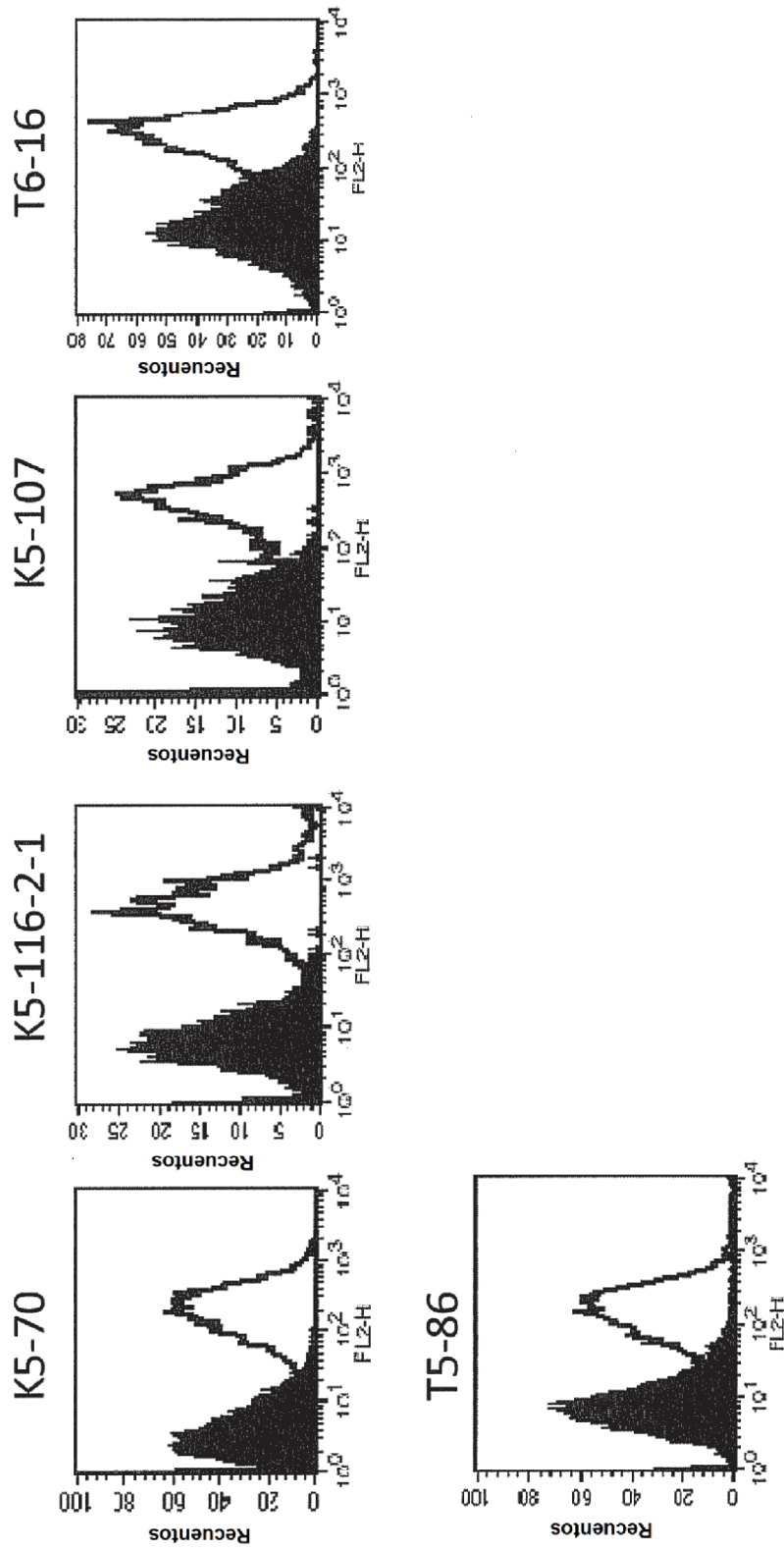


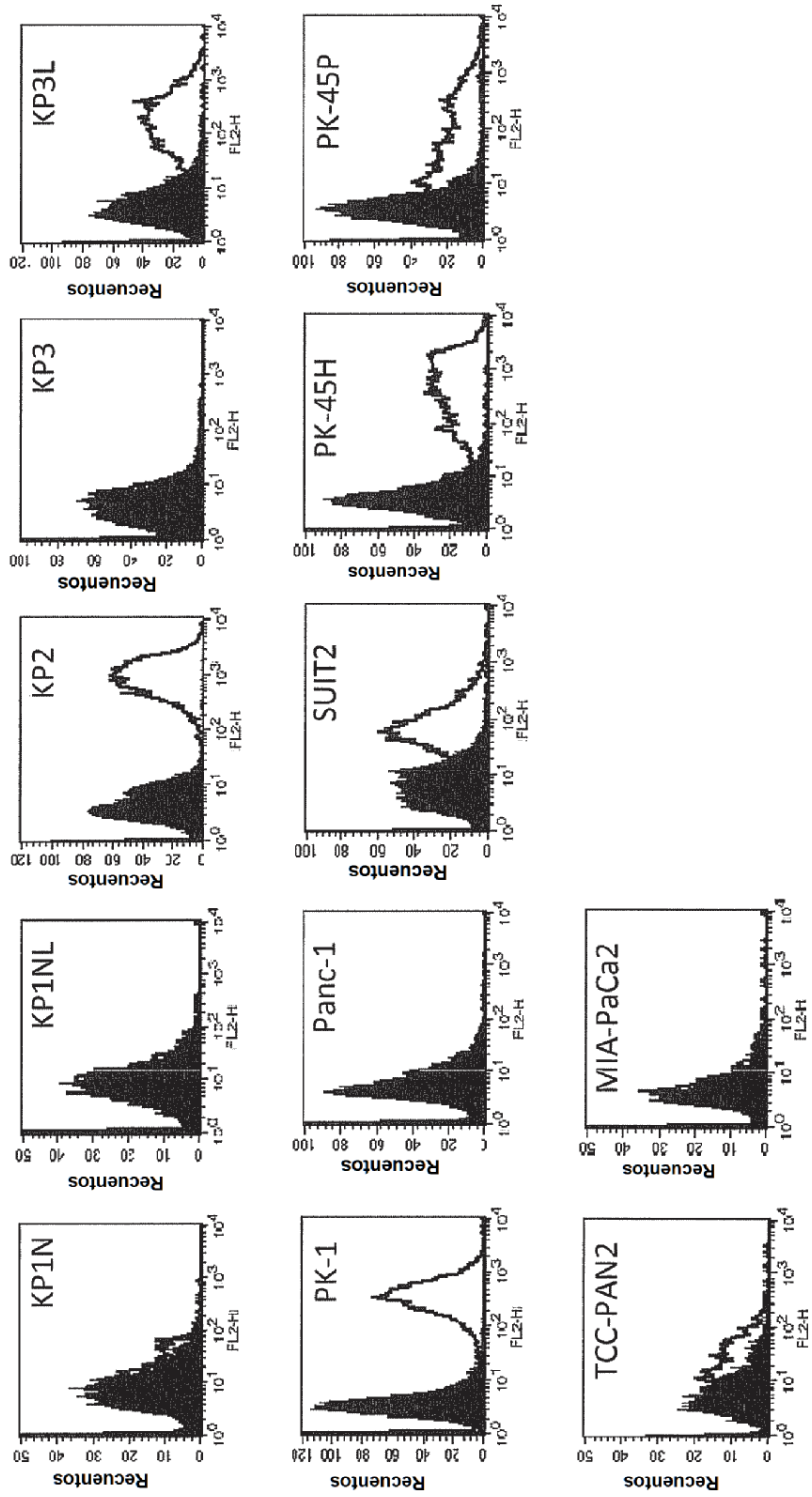
Fig.4

BxPC-3



Otras líneas de células de cáncer

Fig.5



Otras líneas de células de cáncer

Fig.6

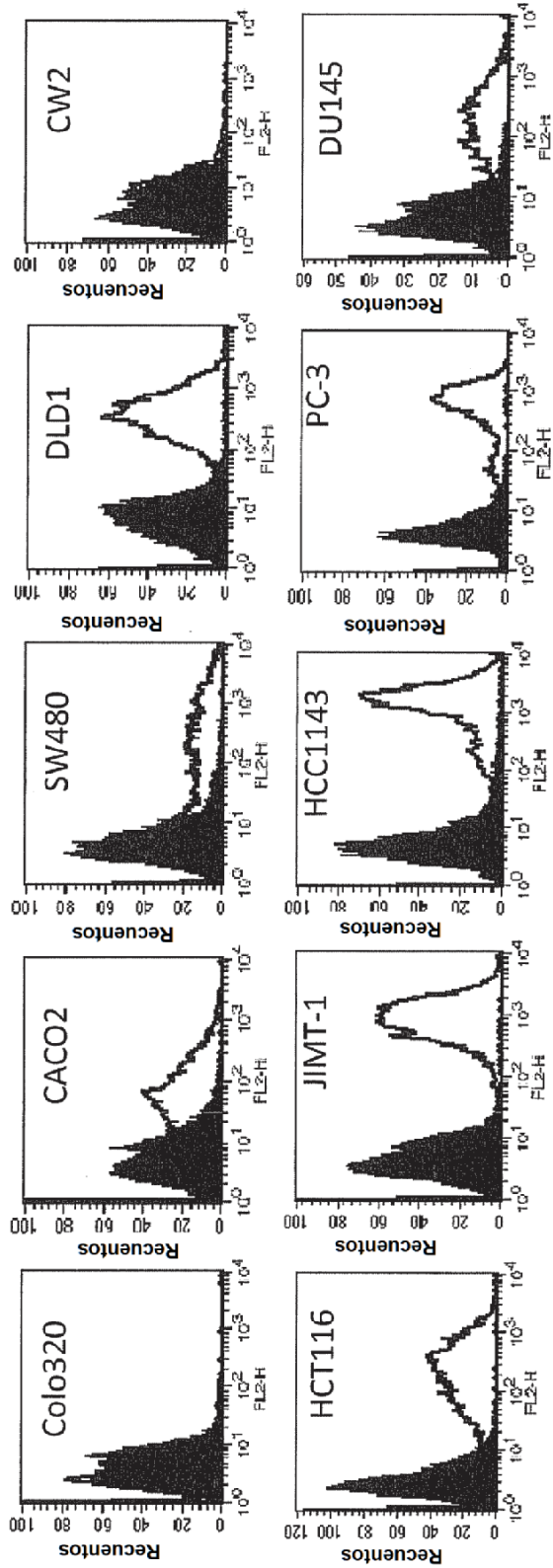


Fig.7

Reactividad con ratón TROP-2

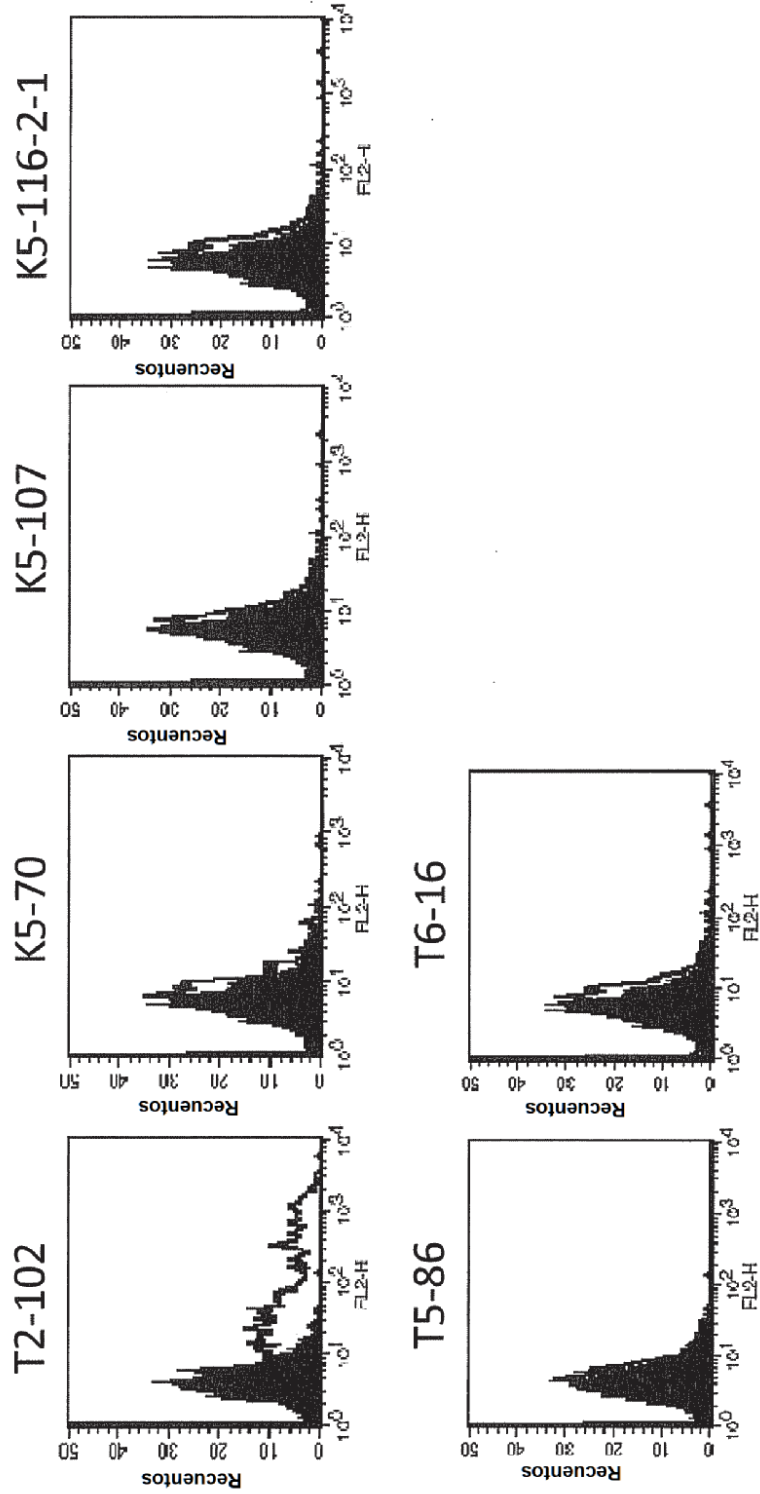




Fig.8

Reactividad con EpCAM/hTROP-1

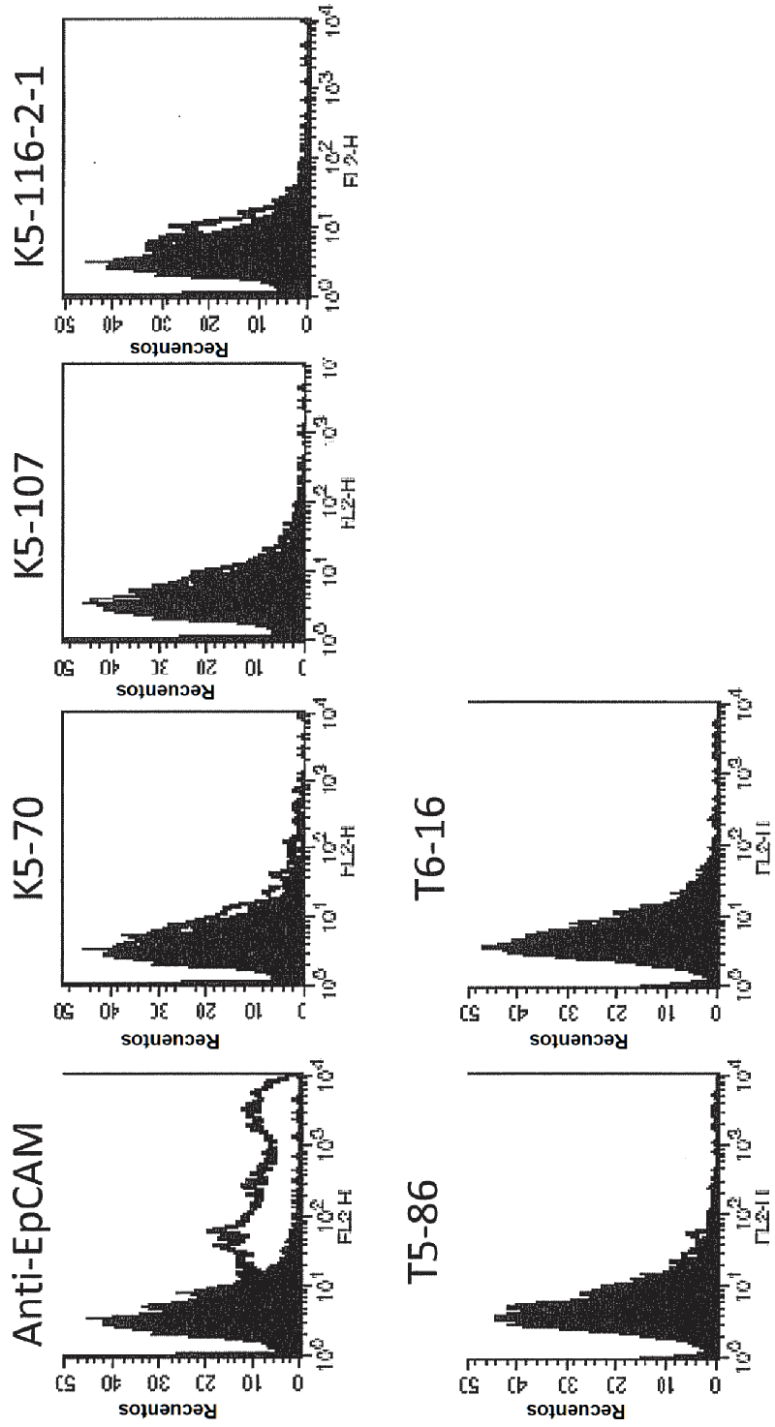


Fig.9

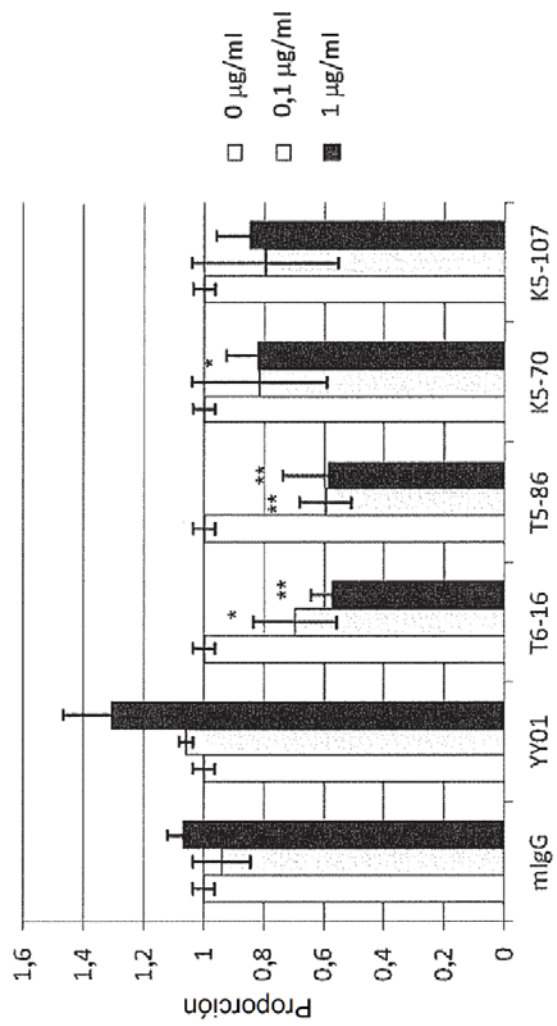


Fig.10

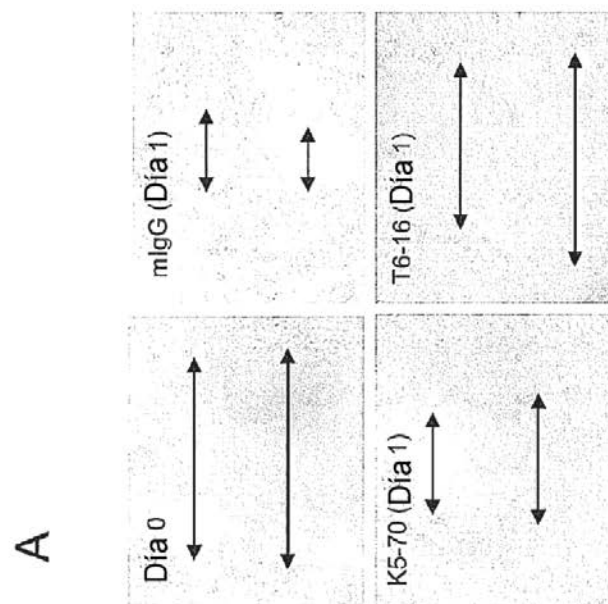
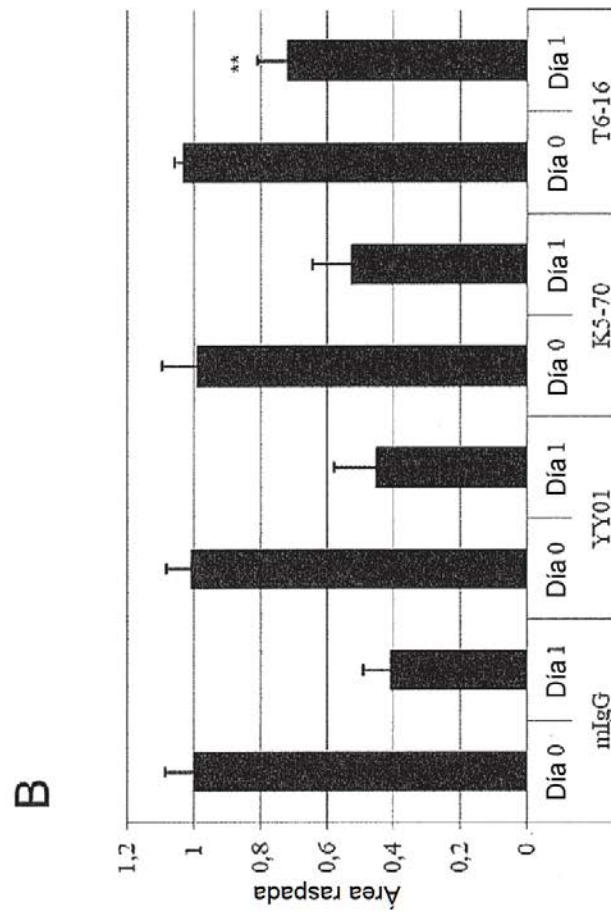
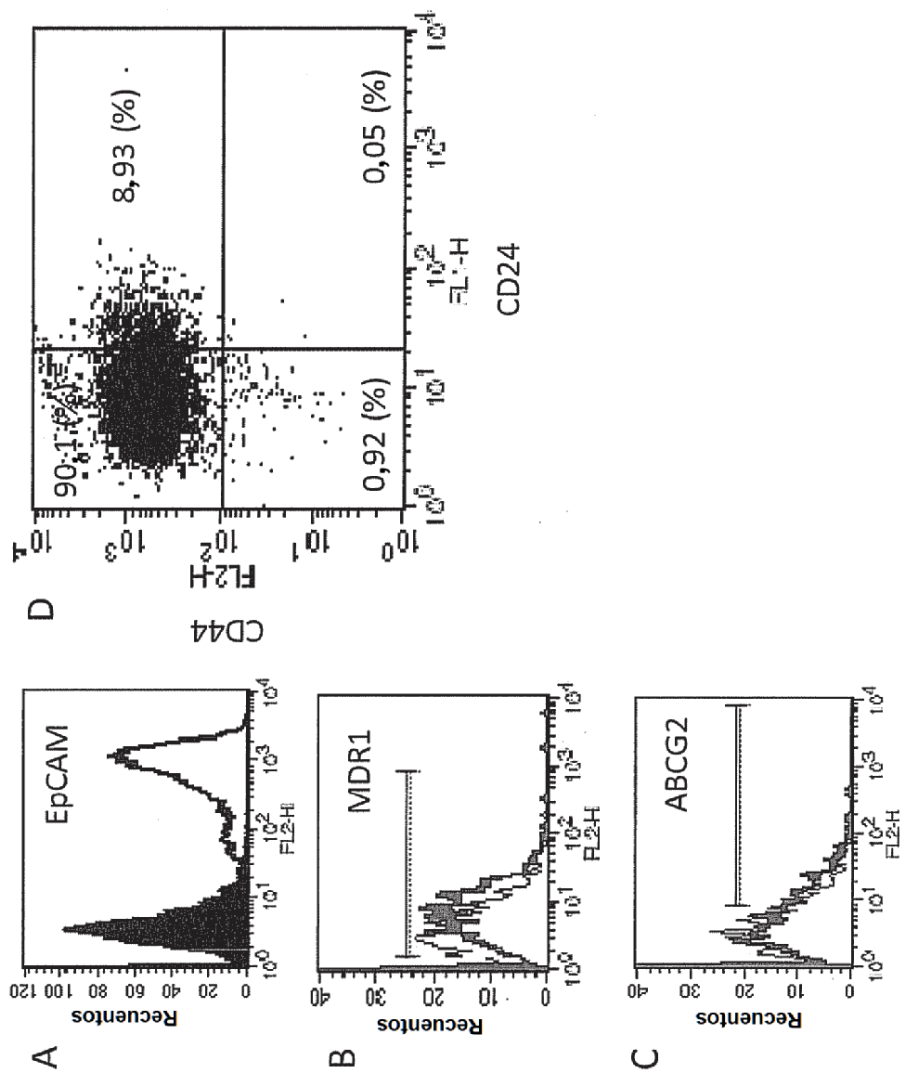


Fig.11



K5-70 / Tratamiento

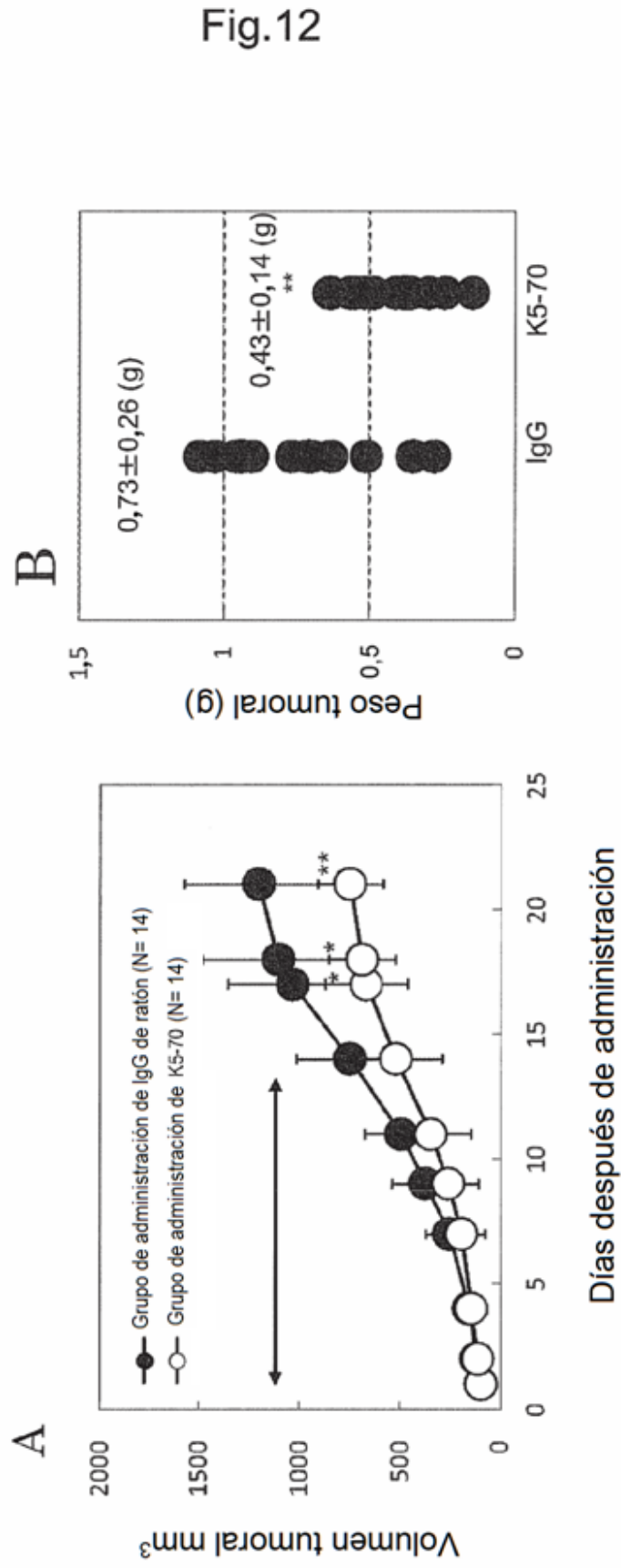


Fig.13

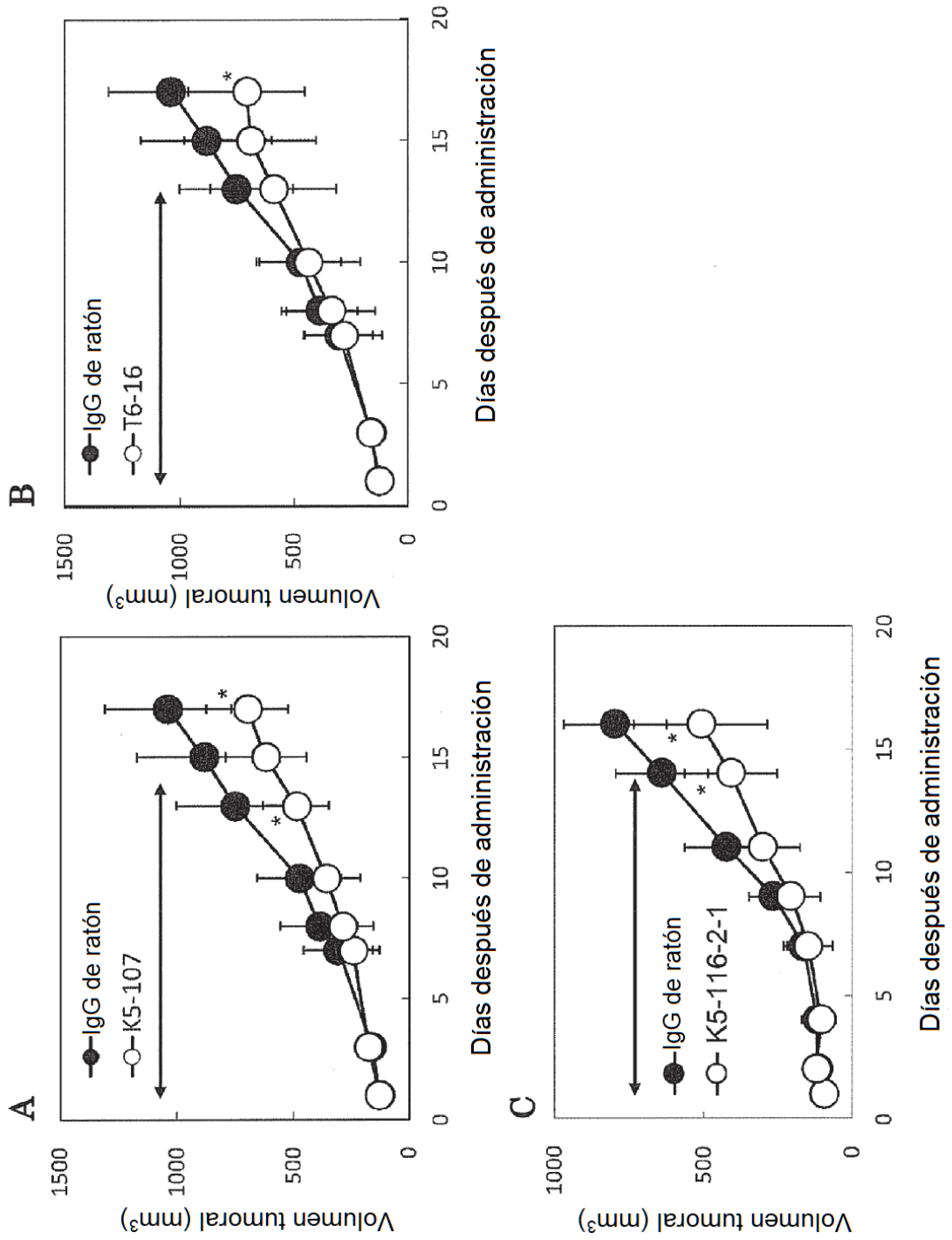
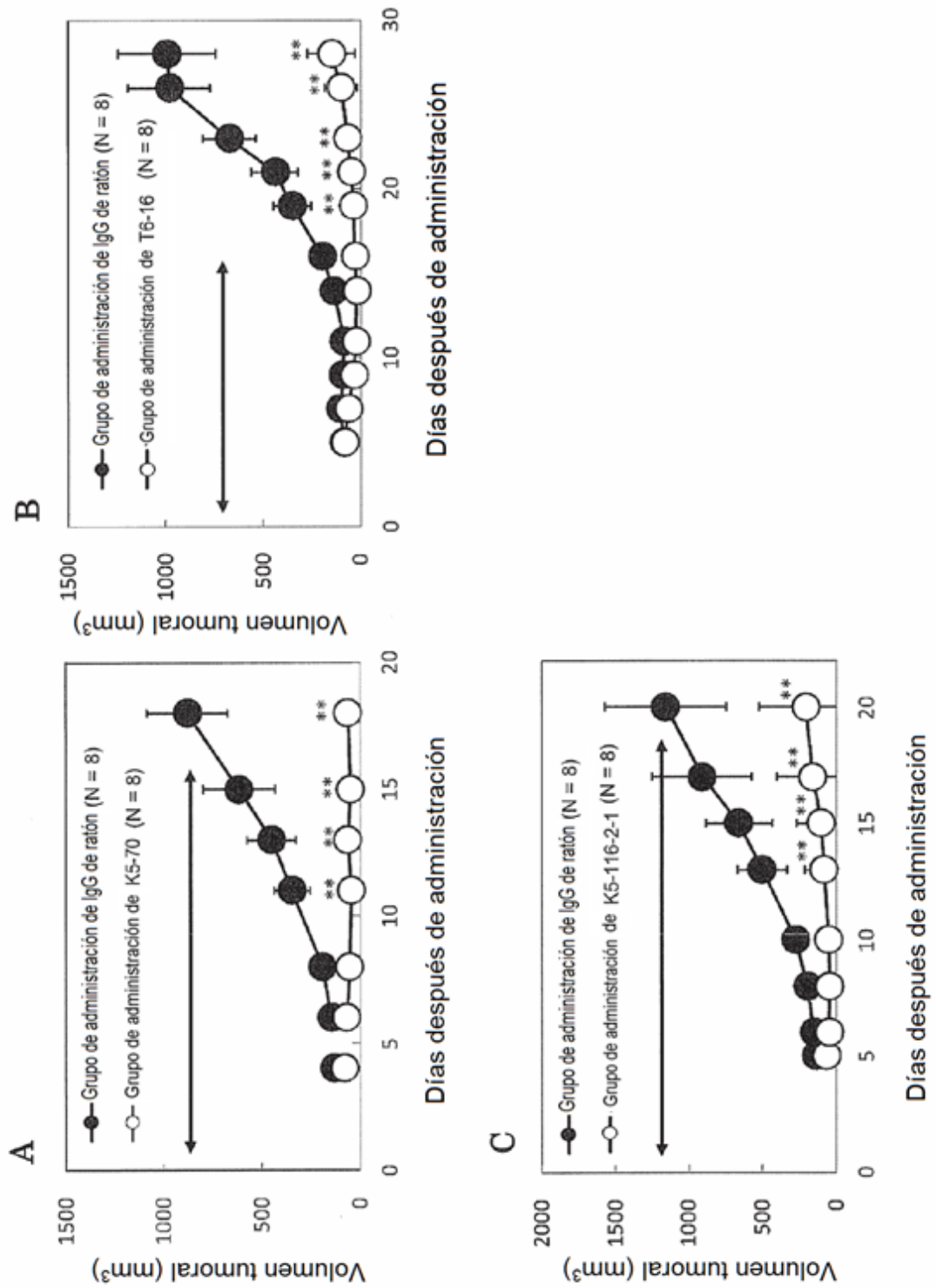
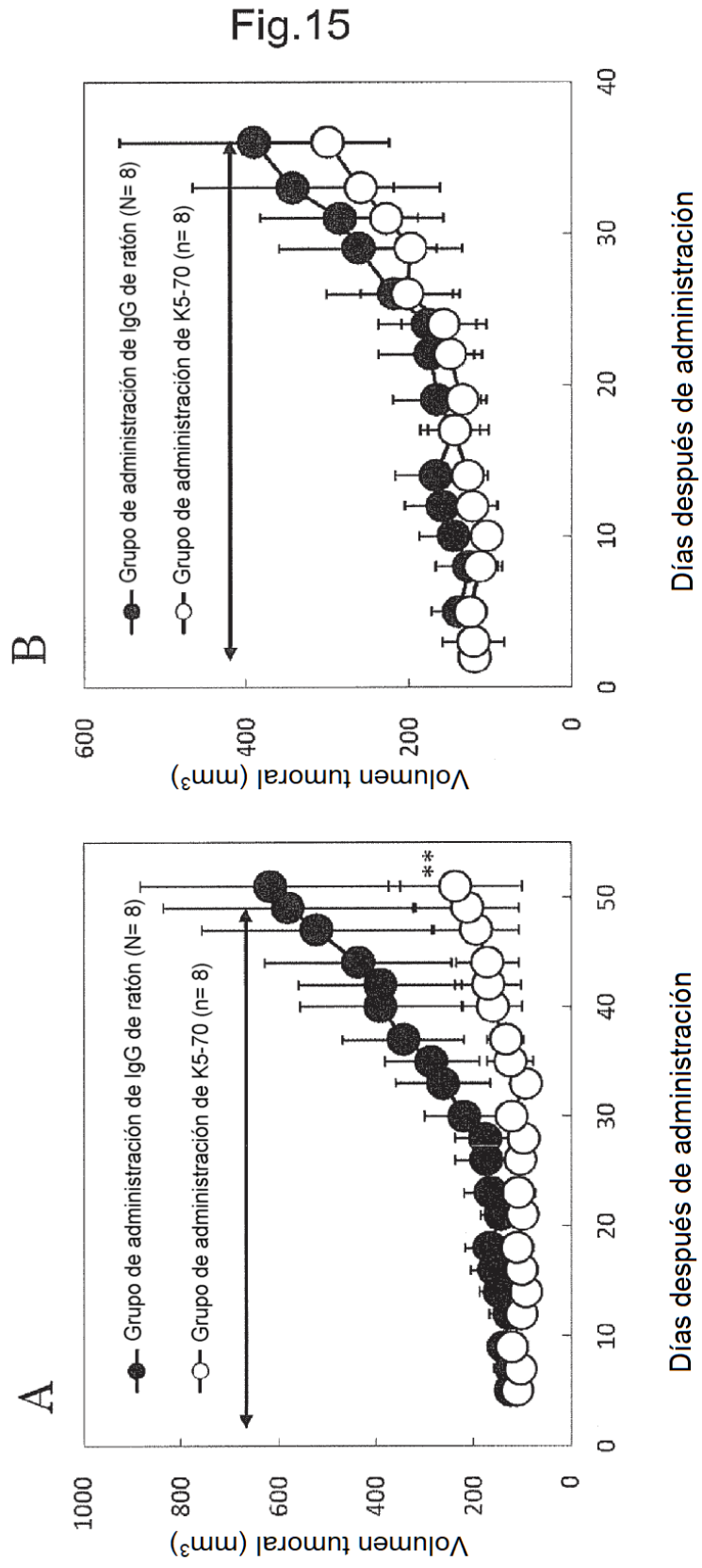


Fig.14



K5-70 /BxPC-3





K5-70/prevencción dependiente de la dosis

Fig.16

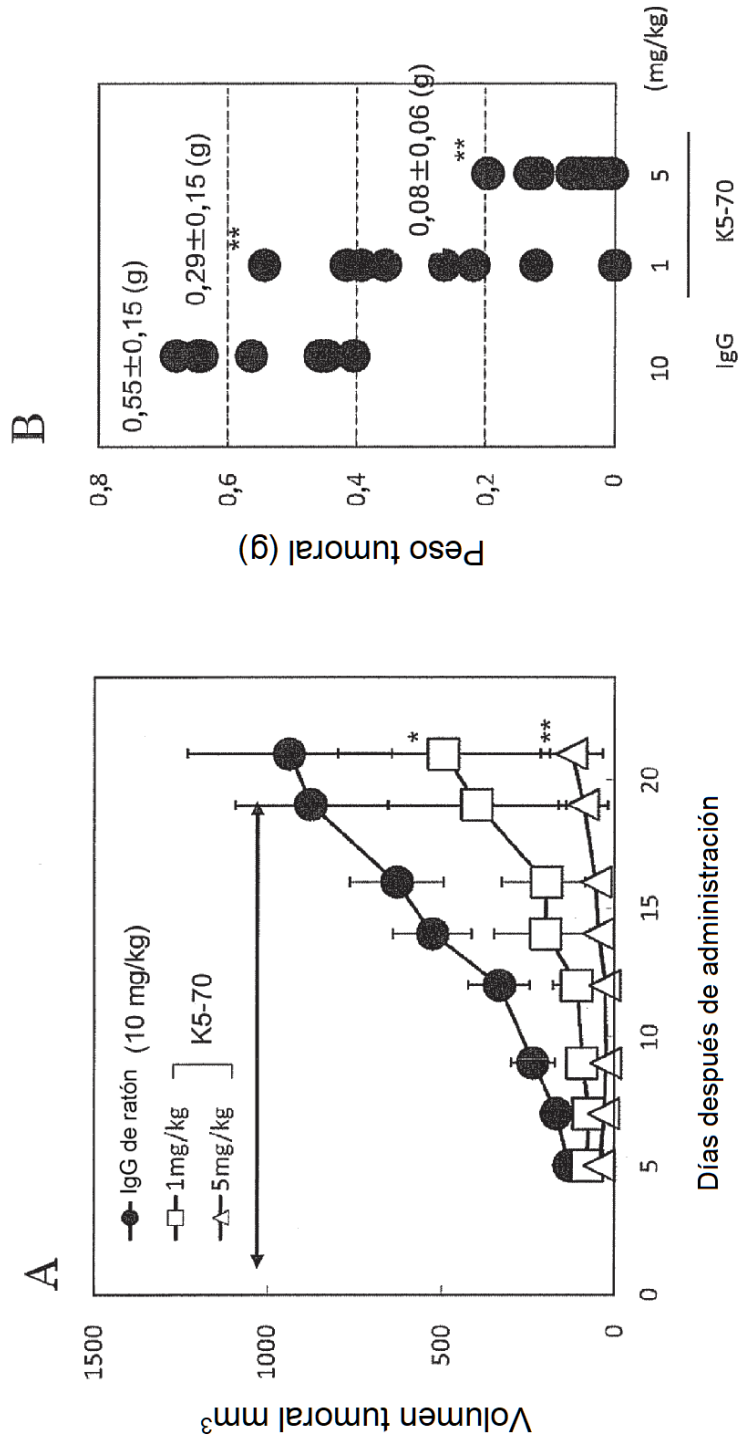


Fig.17

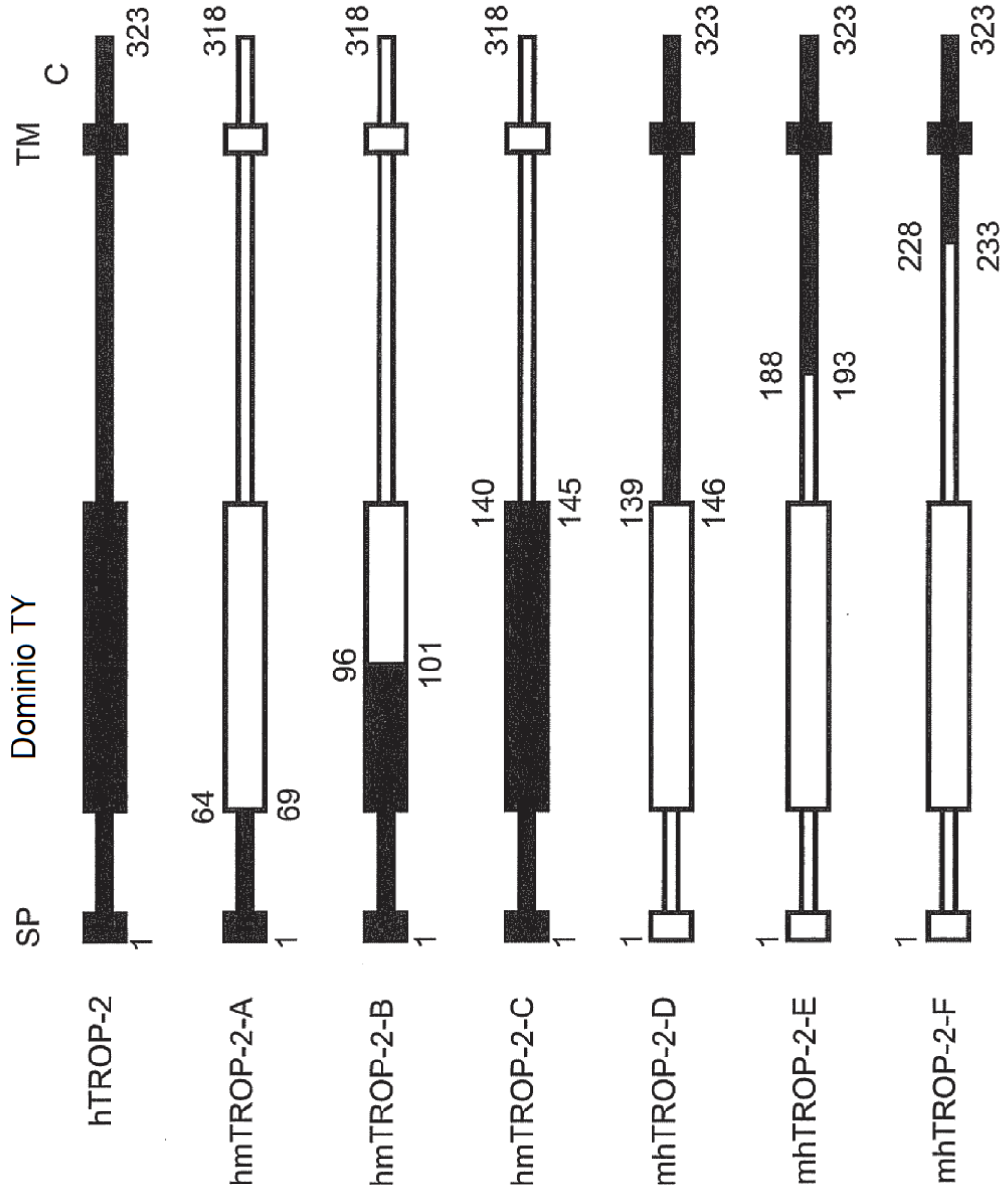


Fig.18

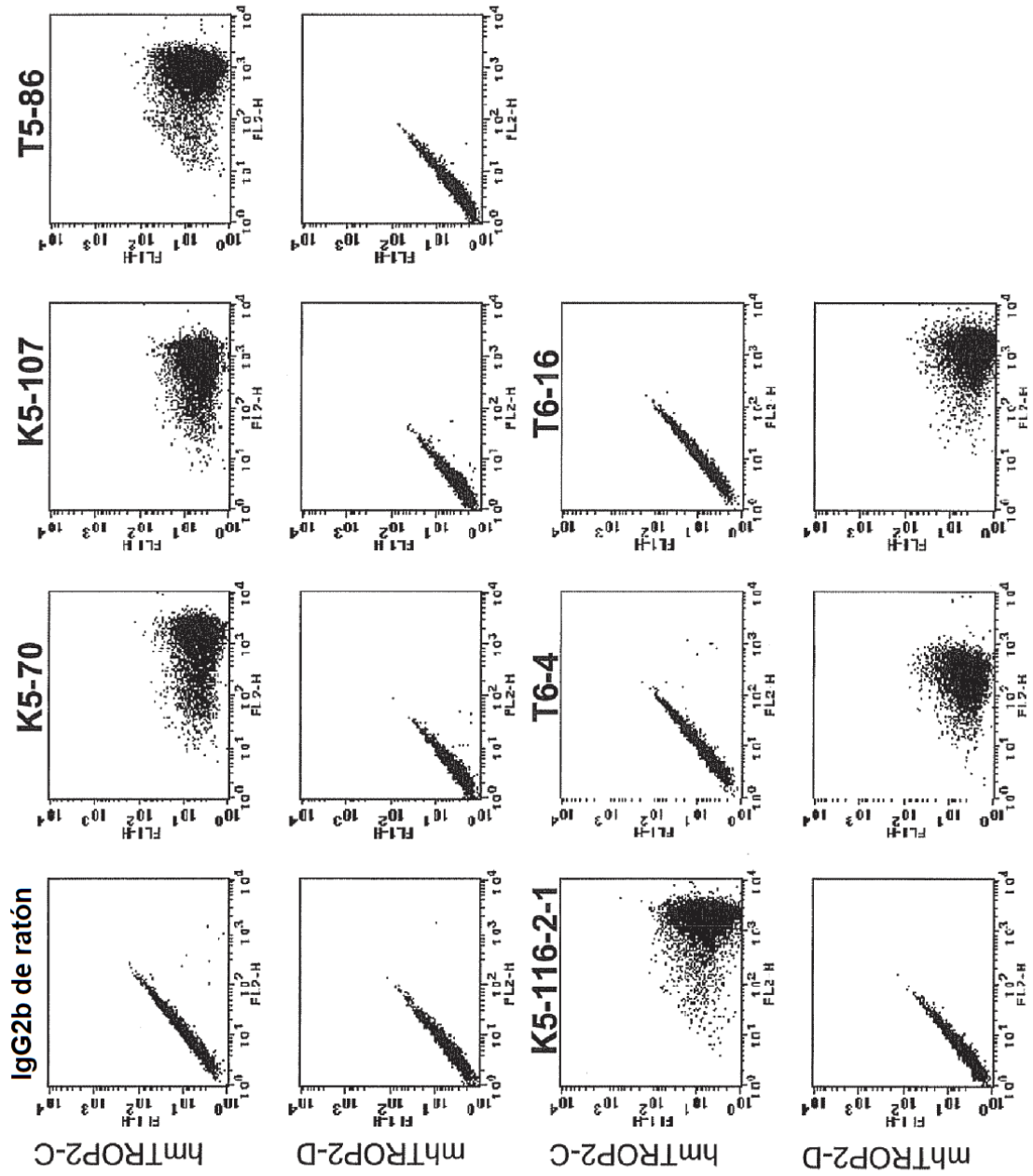


Fig.19

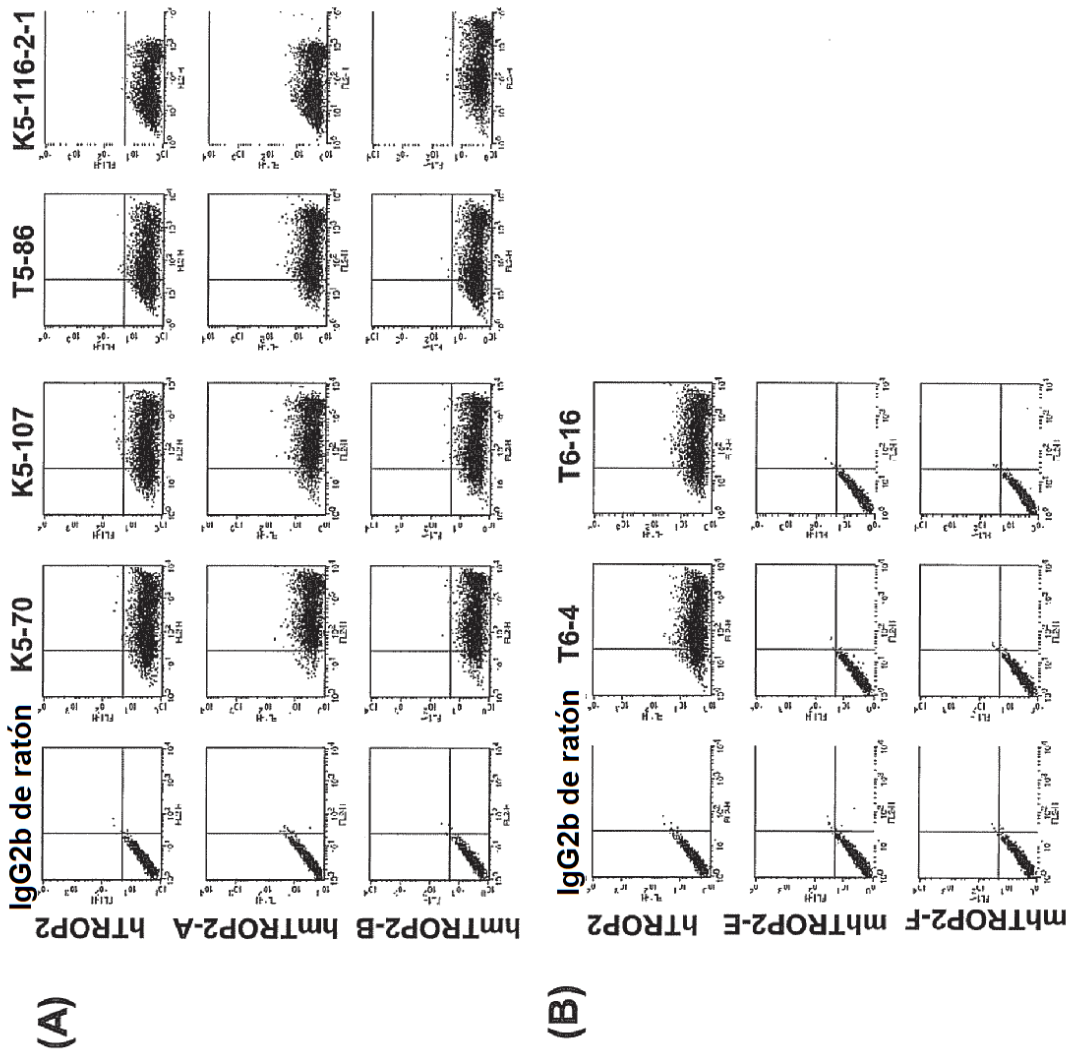


Fig.20

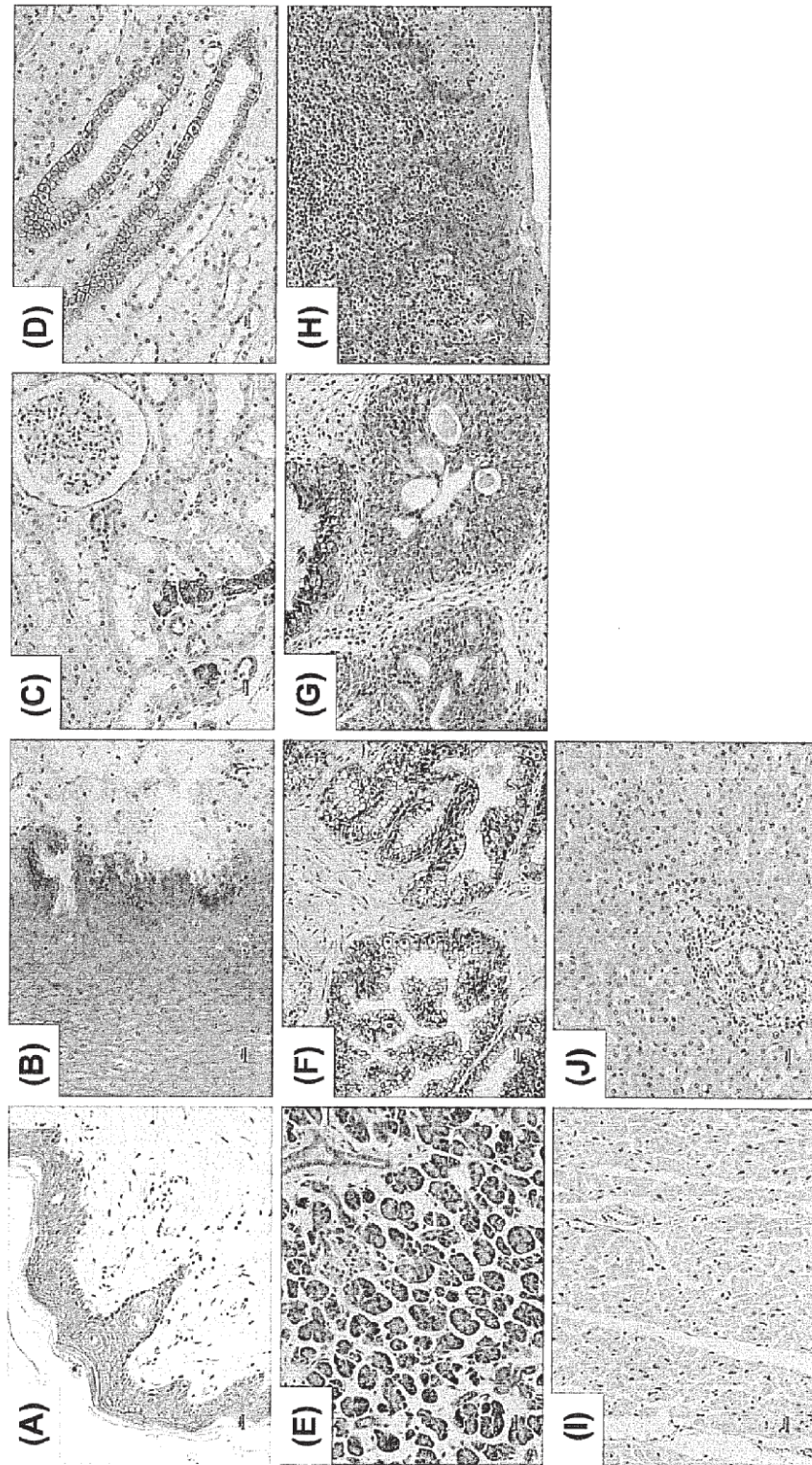




Fig.21

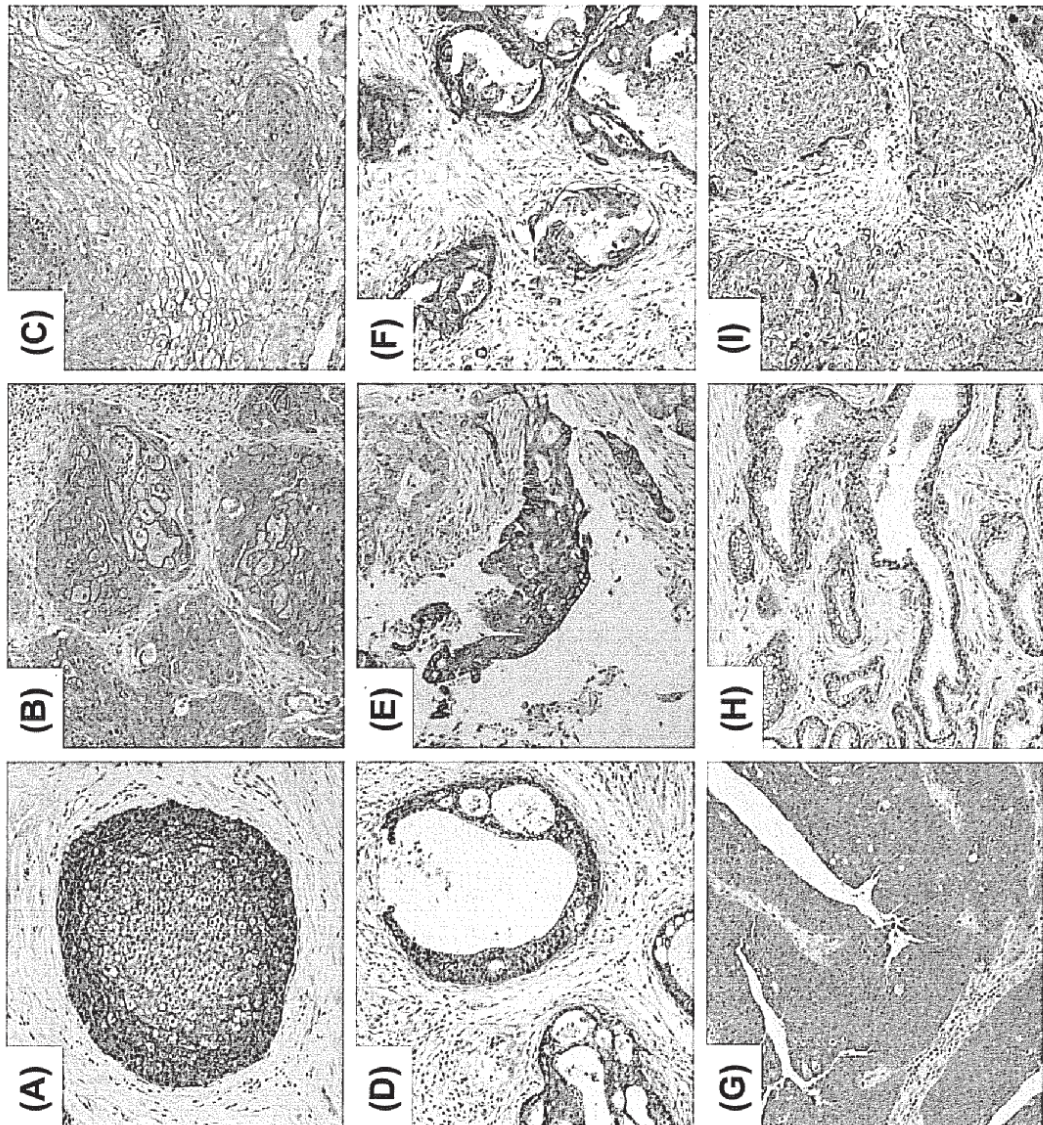


Fig.22

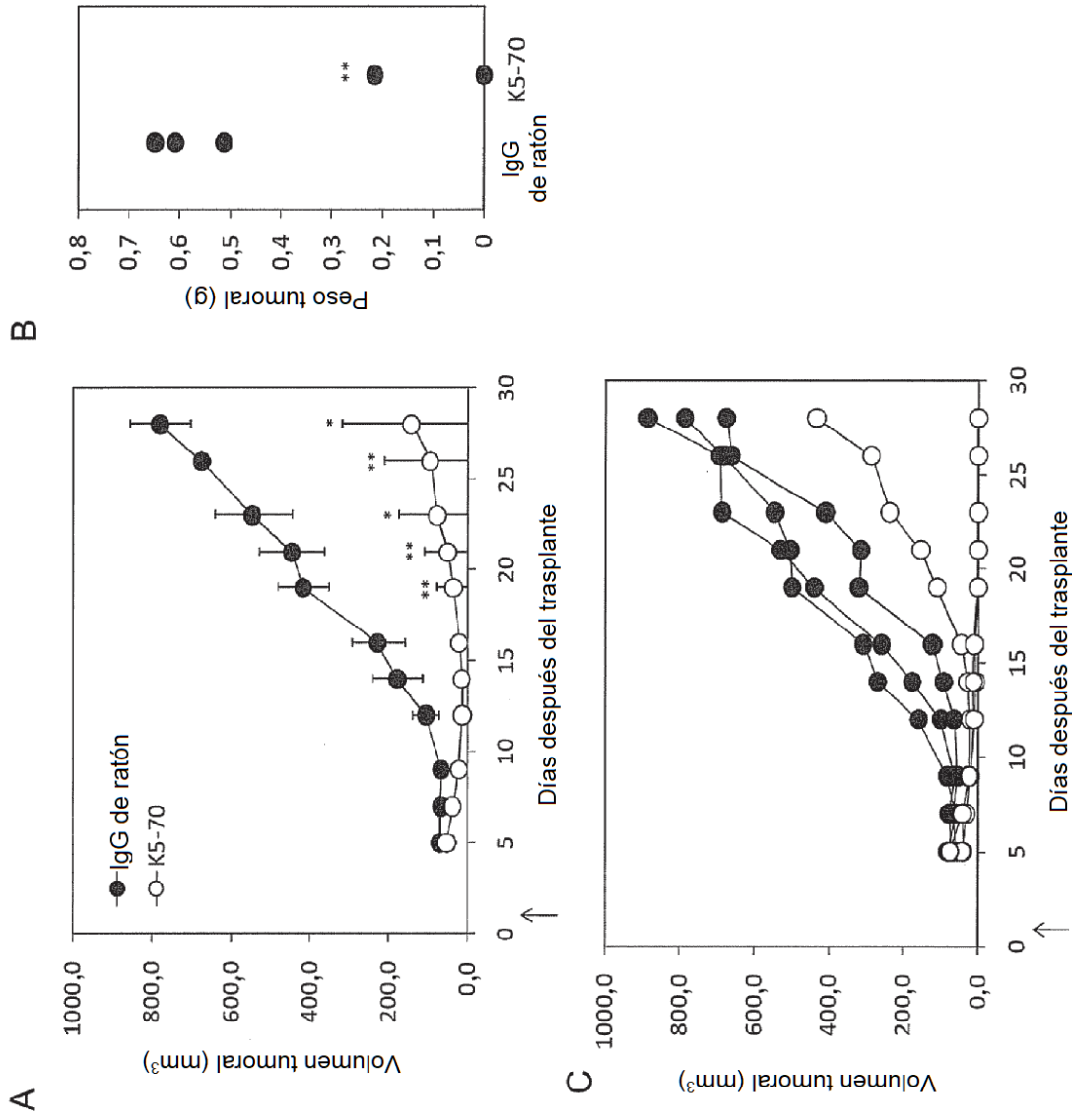


Fig.23

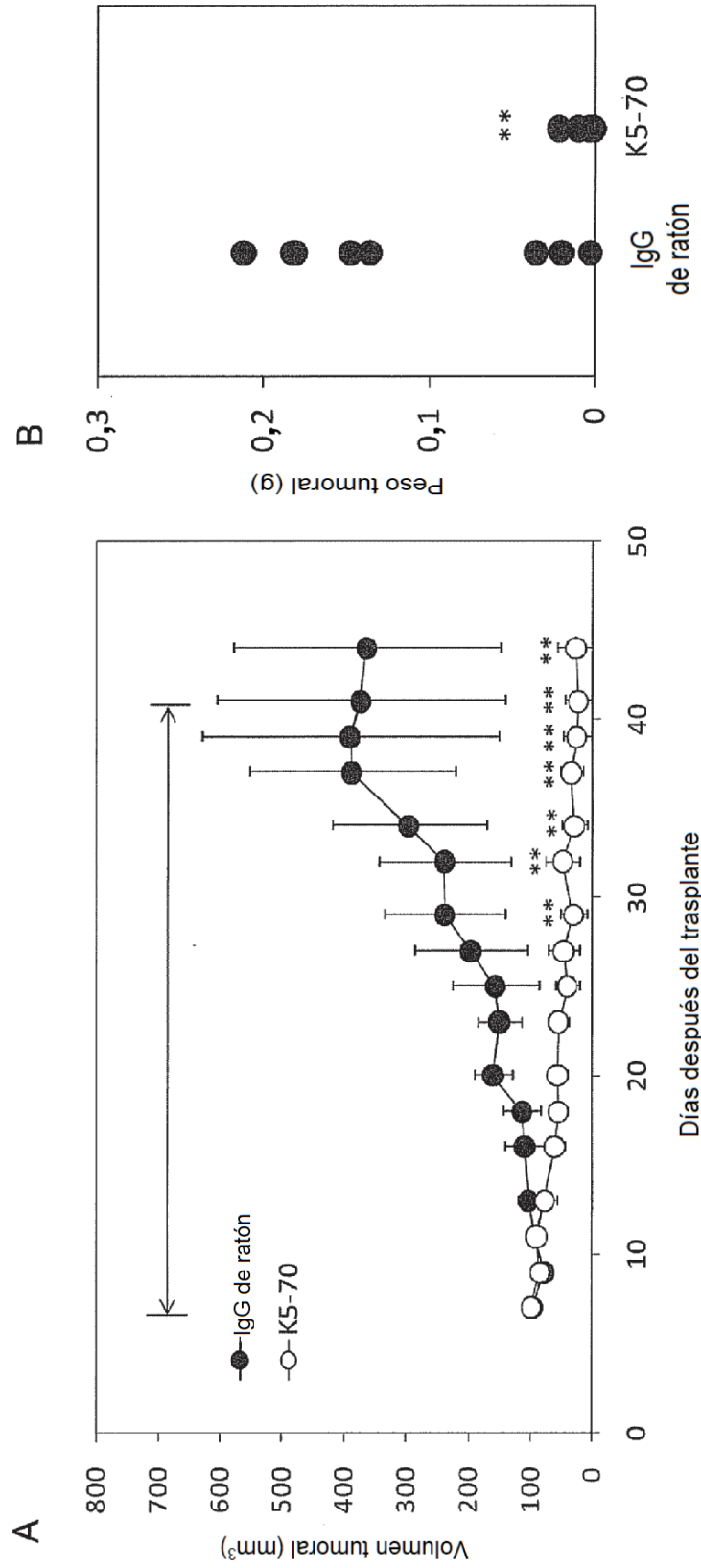






Fig.25

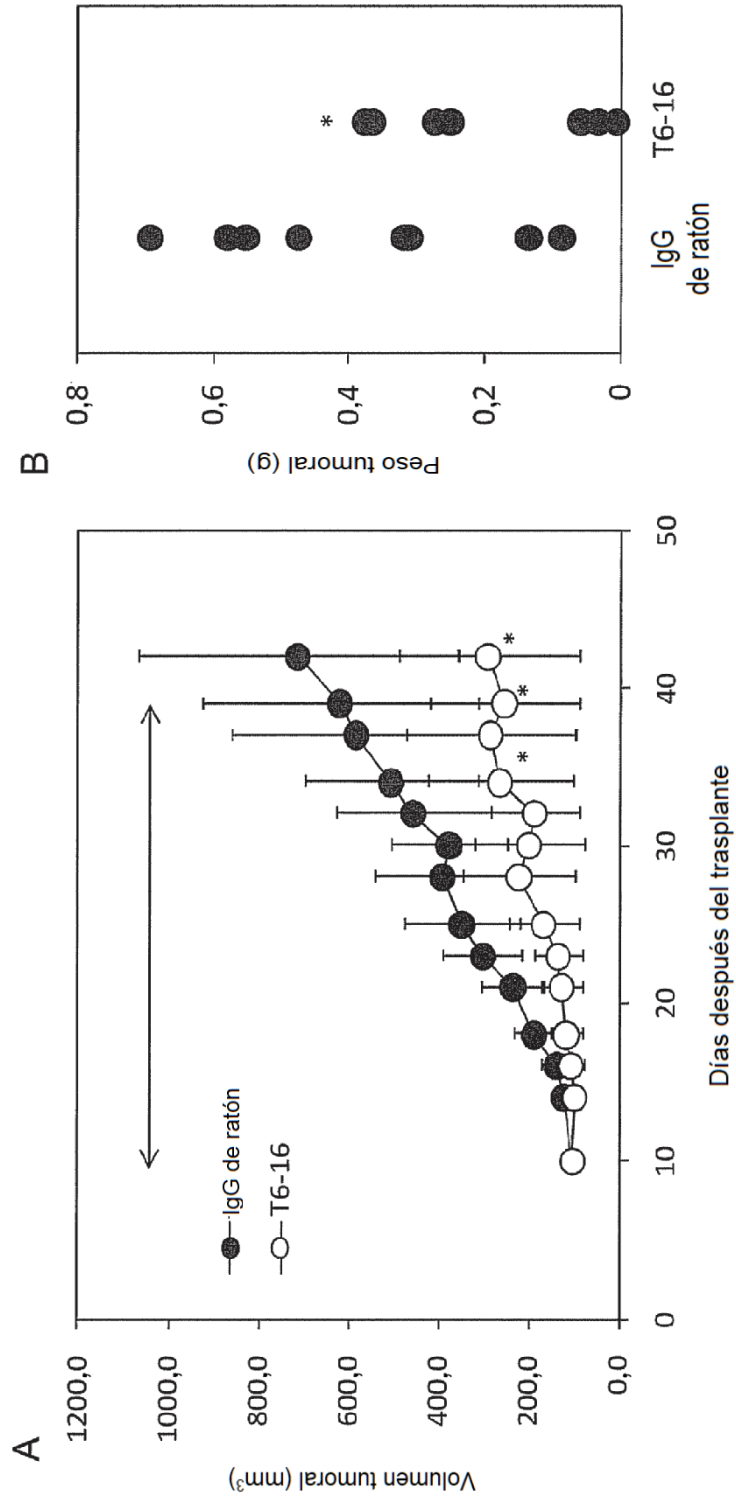


Fig.26

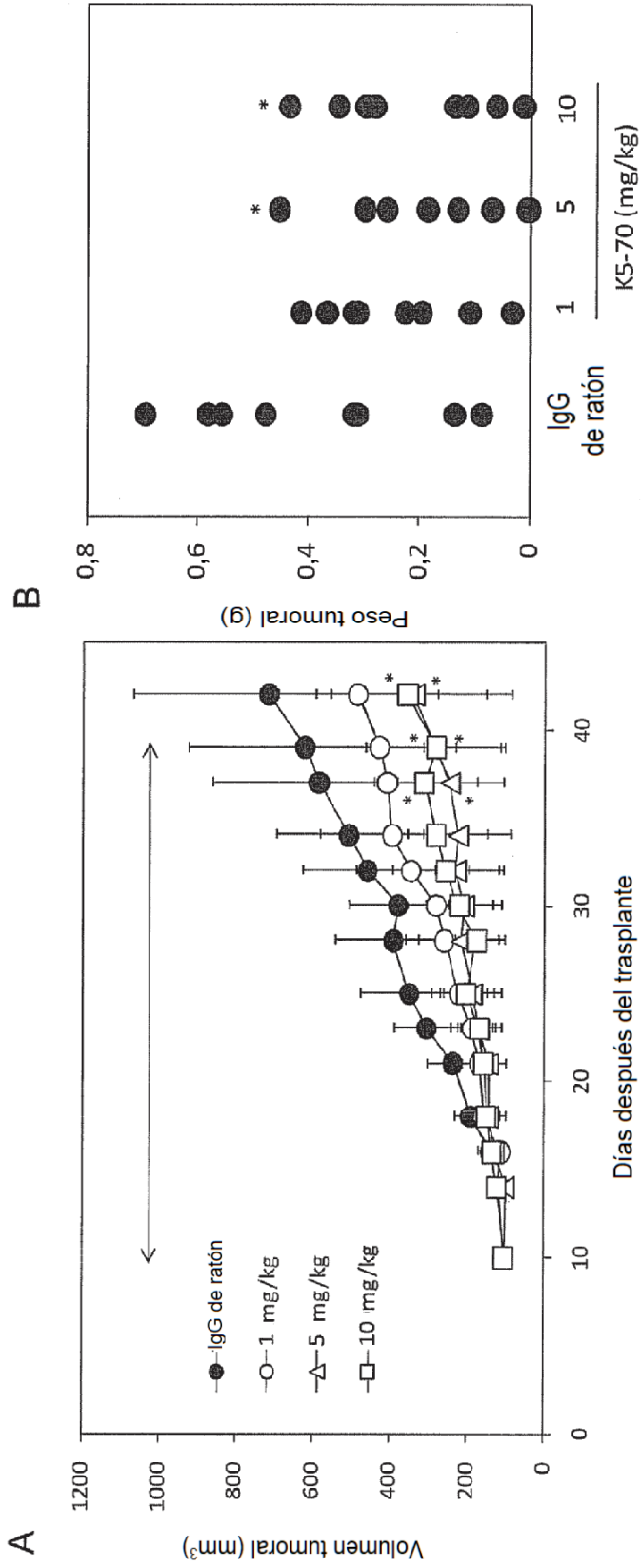


Fig.27

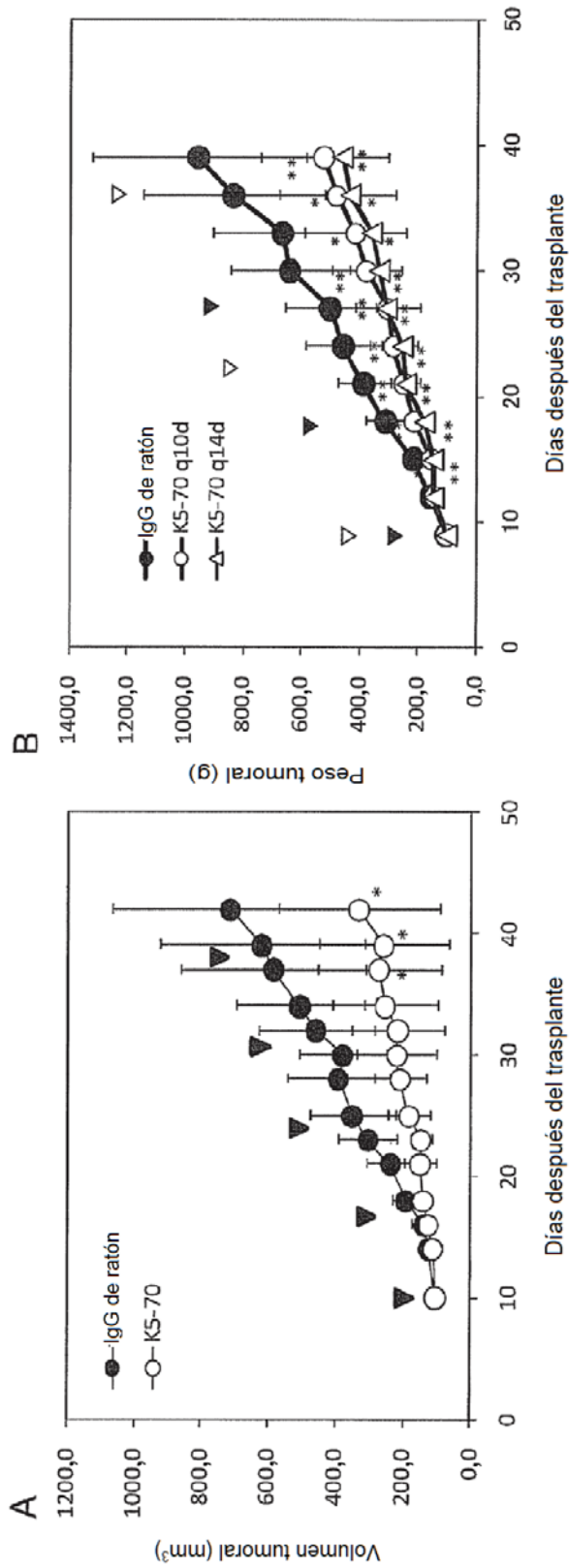


Fig.28

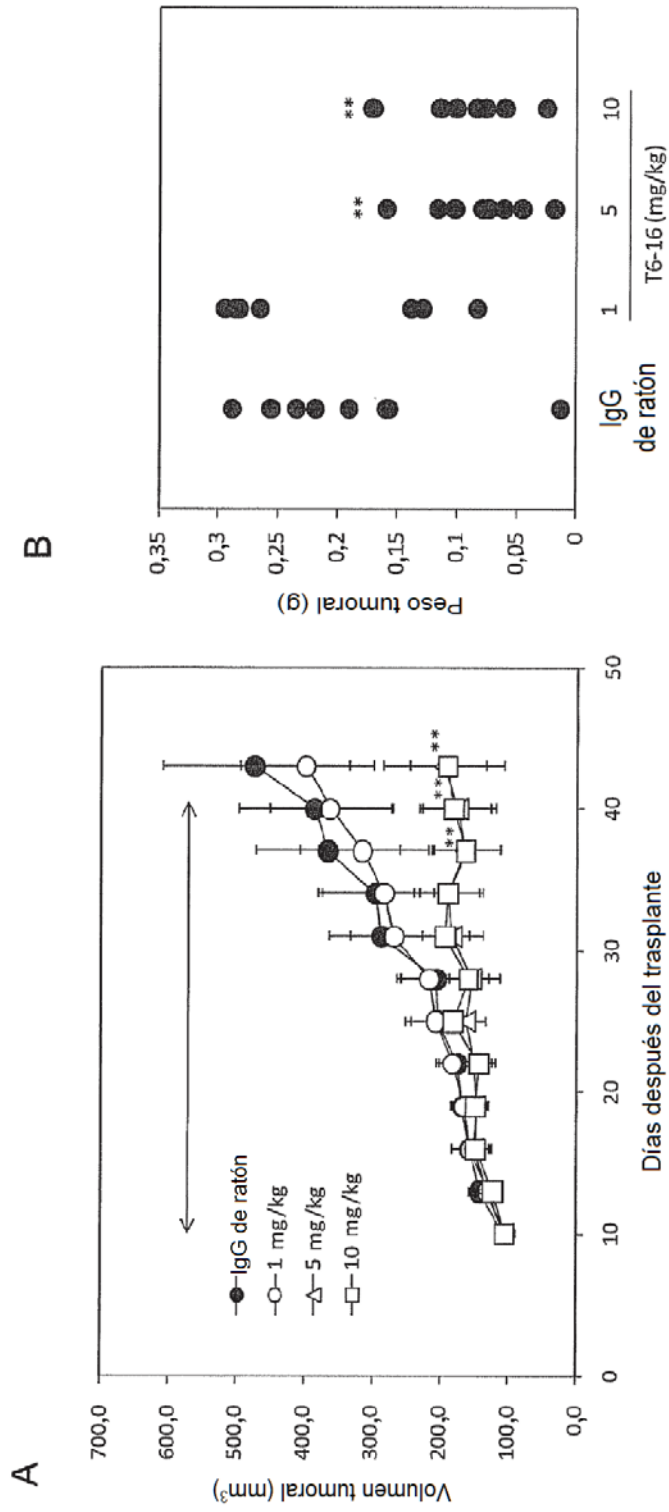


Fig.29

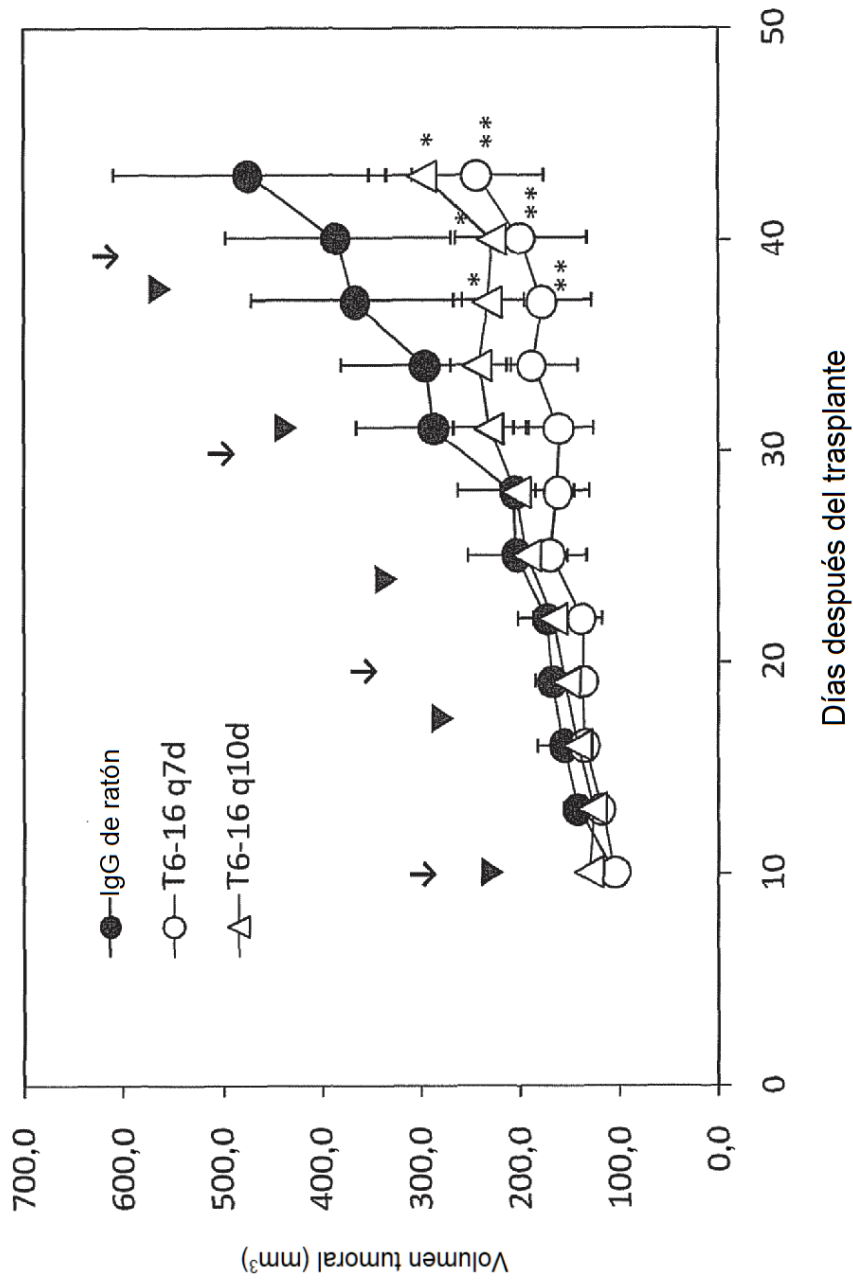


Fig.30

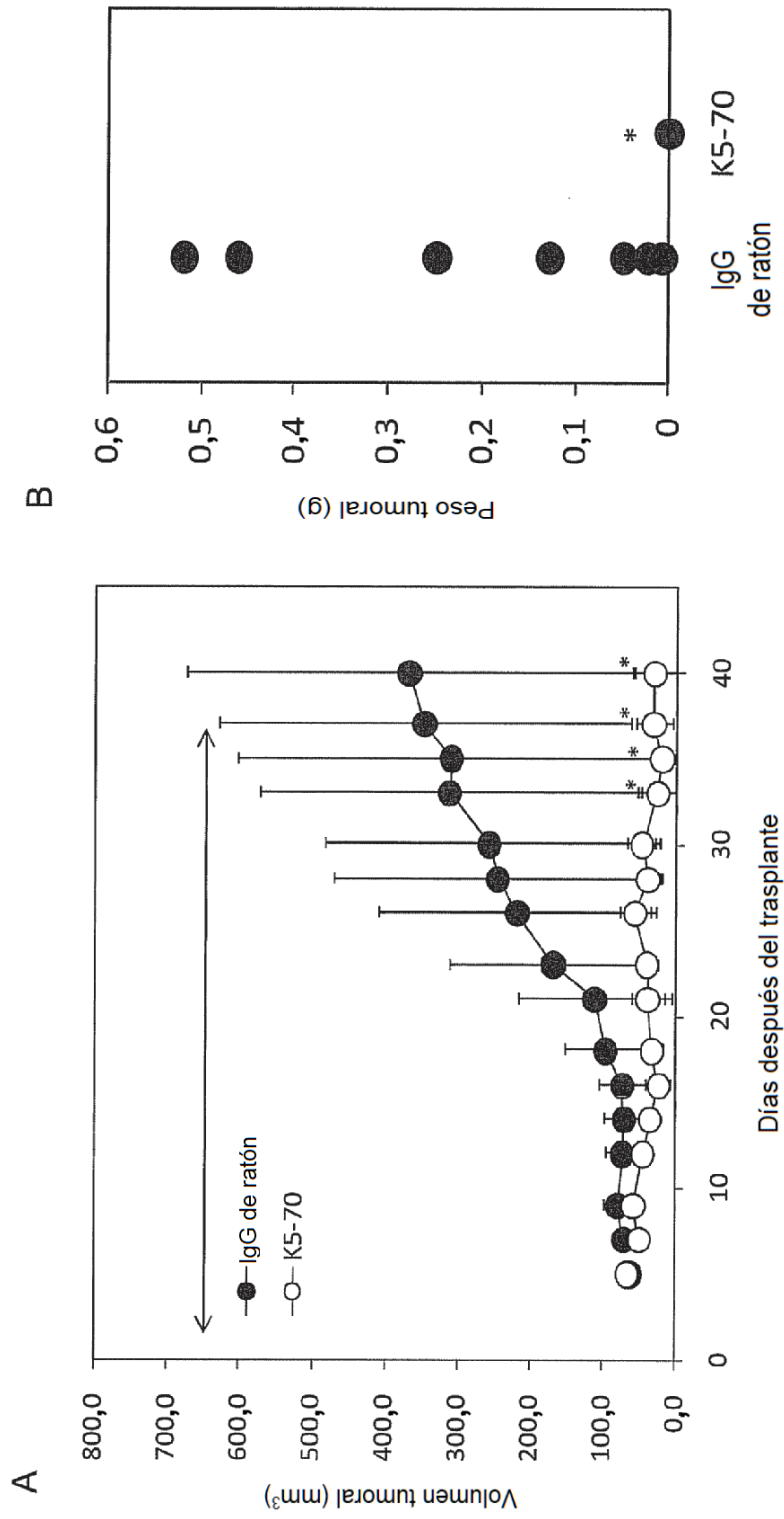


Fig.31

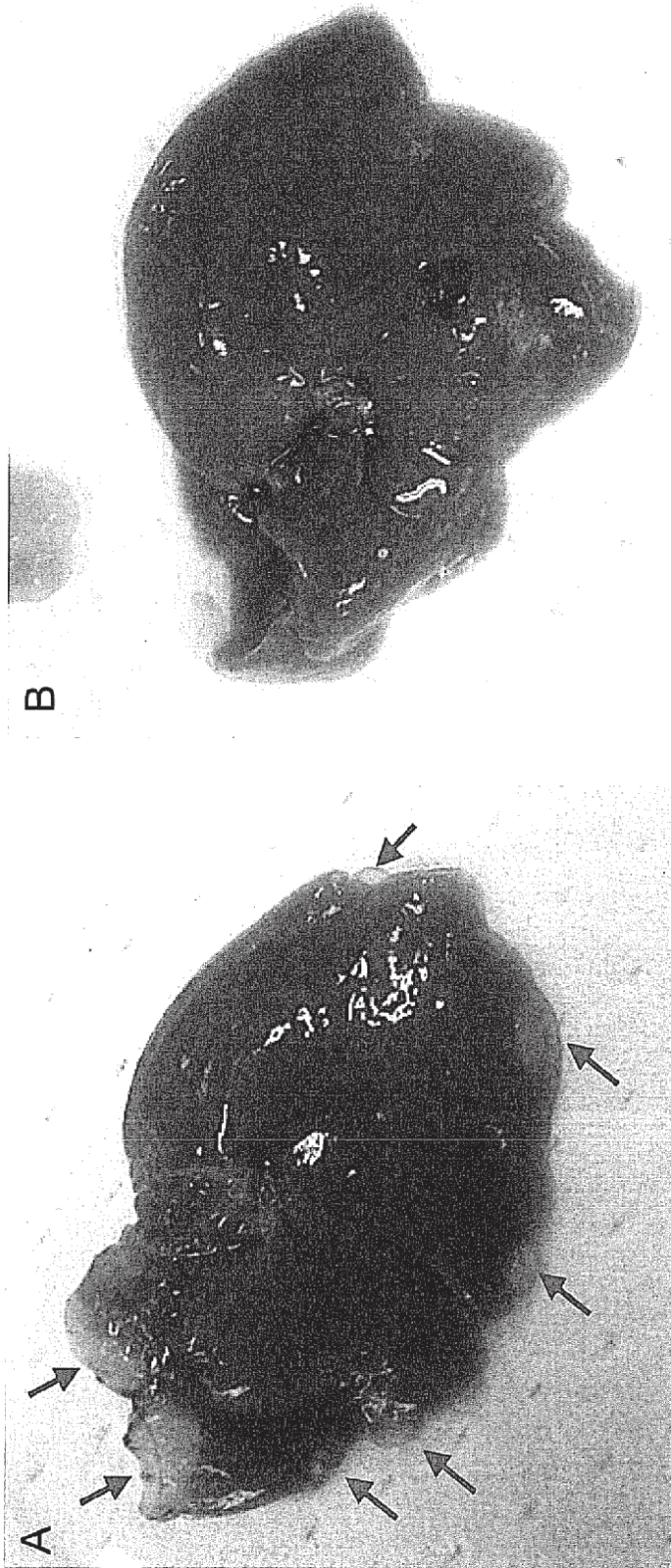




Fig.32

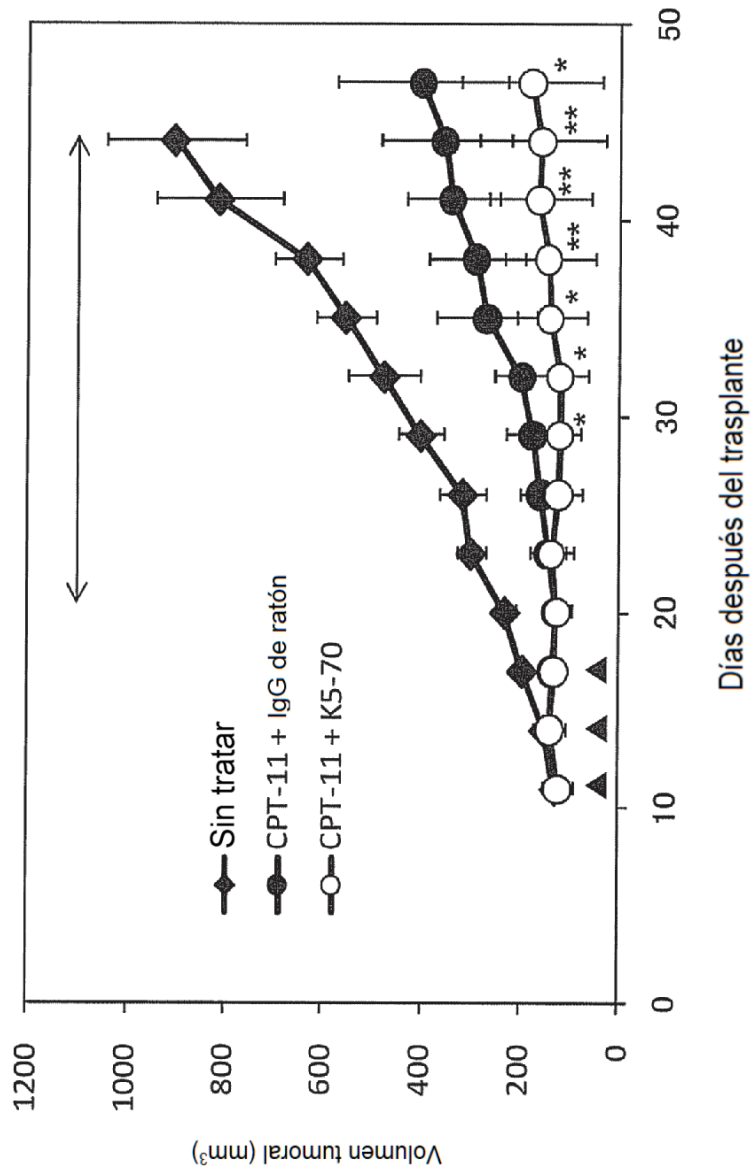


Fig.33

K5-70  
VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG  
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q  
GTCCAAC TGCAGCAGCC TGGGGCTGAGCTGGTGAGGCC TGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC  
V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S  
TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCATCTACTGGATAAACTGGTGAAACAGAGGCCT  
C K A S G Y T F T I Y W I N W V K Q R P  
GGACAAGGCC T T G A G T G G A T C G G A A A T A T T T A T C C T T C T G A T A G T T A T A C T A A C T A C A A T  
G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N  
CAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACAT TGACTGTAGACAAAATCCCTCCAGCACAGCCCTACATG  
Q K F K D K A T L T V D K S S T A Y M  
CAGCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAACGTCATG  
Q L S S P T S E D S A V Y Y C T R T S M  
GCGGACTACTGGGGCC AAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA  
A D Y W G Q G T T L T V S S

Fig.34

K5-70  
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTGGCTTTTCTGGATTCAGCCCTCCAGAGGT  
 M V S T P Q F L V F L L F L F W I P A S R G  
 GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT  
 D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S  
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCAATTGGCACAAAGCATACTGGTATCAGCAAAGAACA  
 F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T  
 AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC  
 N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S  
 AGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACACAGTGTGGAGTCT  
 R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S  
 GAAGATAATTGCAGATTAATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTACGTTCCGGCTCG  
 E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S  
 GGGACAAAGTTGGAAATAAAA  
 G T K L E I K

K5-107  
VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG  
 M G S C I I L F L V A T A T G V H S Q  
 GTCCAACTGCAGCAACCTGGGTCTGAGCTGGTGAGGCCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGTCC  
 V Q L Q Q P G S E L V R P G A S V K L S  
 TGCAAGGCTTCTGGCTACACATTACCCAGCTACTGGATGCACCTGGTGAAGCAGAGGCAT  
 C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R H  
 GGACAAGGCTTGAGTGGATTGGAATAATTATCCTGTGGTGGTTATACTAACTACGAT  
 G Q G L E W I G N I Y P G G Y T N Y D  
 GAGAAGTTCAAGAGCAAGGGCACACTGACTGTAGACACACATCCTCCAGCACAGCCTACATG  
 E K F K S K G T L T V D T S S S T A Y M  
 CACCTCAGCAGCCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTACAAGATCATCCGTT  
 H L S S L T S E D S A V Y Y C T R S S V  
 TTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCCCTCA  
 F D Y W G Q G T T L T V S S

Fig.35

Fig.36

K5-107  
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTAATTTTGGCTTTTCTGGATTCCAGCCCTCCAGAGGT  
 M V S T P Q F L V F L L F L L F W I P A S R G  
 GACATCTTGCTGACTCAGTCCAGCCATCCGTGTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT  
 D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S  
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAAGCATACACACTGGTTTTCAGCAAAGAACA  
 F S C R A S Q N I G T S I H W F Q Q R T  
 AATGGTTCCTCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC  
 N G S P R L I K Y A S E S I S G I P S  
 AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT  
 R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S  
 GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTCAAGTTCCGGCTCG  
 E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S  
 GGGACAAAGTTGGAAATAAAA  
 G T K L E I K

Fig.37

K5-116-2-1  
VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG  
 M G S C I I L F L V A T A T G V H S Q  
 GTCCAAC TGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC  
 V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S  
 TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTCACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCT  
 C K A S G Y T F T S Y W I T W V K Q R P  
 GGACAAGGCCCTTGAGTGGATCGGAAATA TTTATCCCTTCTGTAGTATTATACTAACTACAAT  
 G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N  
 CAAAAGTTCAGGGACAAGGCCACAT TGACTGTAGACAAAATCCTCCAGTACAGCCTACATG  
 Q K F R D K A T L T V D K S S S T A Y M  
 CAGCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAGCCCTCTTTGAC  
 Q L S S P T S E D S A V Y Y C S A L F D  
 TACTGGGCCAAGGCACCACCTCTCACAGTCTCCCTCA  
 Y W G Q G T T L T V S S

K5-116-2-1  
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTGGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT  
 M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G  
 GACATCTGTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT  
 D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S  
TTCTCCTGCAGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAAGCATAACACTGGTATCAGCAAAGAACA  
 F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T  
 AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCCTTCC  
 N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S  
 AGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTTATTCTTAGCATCAACAGTGGAGTCT  
 R F S G S G S G T D F I L S I N S V E S  
 GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAGTAATAGCTGGCCATTACAGTTCGGCTCG  
 E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S  
 GGGACAAAGTTGGAAATAAAA  
 G T K L E I K

Fig.38

Fig.39

T6-16  
VH

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTCCCTCCTGTCCAGGAACTGCAGGCGTCCACTCTTGAG  
 M G W S W I F L L F L L S G T A G V H S E  
 GTCCAGCTTCAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATTTC  
 V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S  
 TGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTACAATATGCACCTGGGTGAAGCAGAGCCAT  
 C K A S G Y T F T D Y N M H W V K Q S H  
 GGAAGAACCCTTGAATGGATTGGATATATTTATCCCTTACAATGGTGGTACTGGCTACAAC  
 G K N L E W I G Y I Y P Y N G G T G Y N  
 CAGAGGTTCAAGAGCAGGGCCACAATGACTGTAGACAAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG  
 Q R F K S R A T M T V D K S S S T A Y M  
 GAGCTCCGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAAGACTAC  
 E L R S L T S D D S A V Y Y C A R E D Y  
 GGTAGTAGCCCTTATGCTATGGACTATTGGGTCAAGGAACCTCAGTCAATCGTCTCC  
 G S S P S Y A M D Y W G Q G T S V I V S  
 TCA  
 S



Fig.40

T6-16  
VL

ATGAAGTTGCCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTTGCTTCCAGCAGTGAT  
 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D  
 GTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCTGTCCAGTCTTGGAGATCAGGCCCTCCATC  
 V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I  
 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCCTTGTACACGGTAATGGAACACCTATTTACATTTGGTAC  
 S C R S S Q S L V H G N G N T Y L H W Y  
 CTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCCAACCGATTTTCT  
 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S  
 GGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACGGATTTCACACTCAAGATCAGC  
 G V P D R F S G S G T D F T L K I S  
 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTCTTGCTCTCAAACACTACACATGTTCCACG  
 R V E A E D L G V Y F C S Q T T H V P T  
 TTCGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATAAAA  
 F G S G T K L E I K