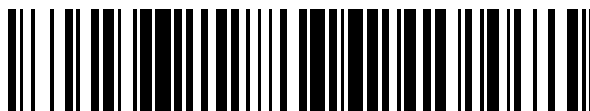


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 903**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 31/4745** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2007.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2014 PCT/JP2014/006421**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015 WO15098099**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2014 E 14874745 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 3088419**

54 Título: **Conjugado de fármaco-anticuerpo anti-trop2**

30 Prioridad:

**25.12.2013 JP 2013267548**

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

**13.03.2019**

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (50.0%)**  
**3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku**  
**Tokyo 103-8426, JP y**  
**SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AGATSUMA, TOSHINORI;**  
**TAKAHASHI, SHU;**  
**HASEGAWA, JUN;**  
**OKAJIMA, DAISUKE;**  
**HAMADA, HIROFUMI y**  
**YAMAGUCHI, MIKI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 703 903 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

Conjugado de fármaco-anticuerpo anti-trop2

**Campo técnico**

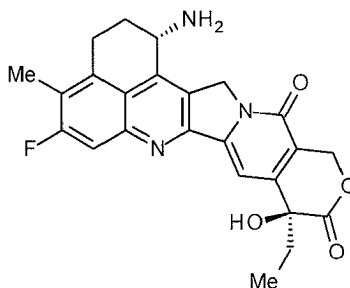
5 La presente invención se refiere a un conjugado de fármaco-anticuerpo que tiene un fármaco antitumoral conjugado con un anticuerpo anti-TROP2 mediante un resto de la estructura del enlazador, siendo el conjugado útil como un fármaco antitumoral.

**Antecedentes de la técnica**

10 Un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) que tiene un fármaco con citotoxicidad conjugado con un anticuerpo, cuyo antígeno se expresa sobre la superficie de células cancerosas y que se une también a un antígeno capaz de internalización celular, y por tanto, puede administrar el fármaco selectivamente a células cancerosas y de esta manera, se espera que se produzca la acumulación del fármaco en las células cancerosas y que destruya las células cancerosas (véanse, Referencias no de patente 1 a 3). Como un ADC, Mylotarg (Gemtuzumab ozogamicina (marca comercial registrada)) en el que la caliqueamicina se conjuga con un anticuerpo anti-CD33 está homologado como un agente terapéutico para la leucemia mieloide aguda. Además, Adcetris (Brentuximab vedotina (marca comercial registrada)), en el que auristatina E está homologada con un anticuerpo anti-CD30, se ha homologado recientemente como un agente terapéutico para el linfoma de Hodgkin y la leucemia anaplásica de células grandes (véase, referencia no de patente 4). Los fármacos contenidos en los ADC que se han homologado hasta ahora se dirigen al ADN o a la tubulina.

20 Con respecto a los compuestos antitumorales de bajo peso molecular, se conocen los derivados de camptotecina, compuestos que inhiben la topoisomerasa I por presentar efecto antitumoral. Entre ellos, un compuesto antitumoral representado por la fórmula siguiente

[Fórmula 1]



25 (exatecán, nombre químico: (1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H, 15H)-diona) es un derivado soluble en agua de camptotecina (Referencias de patente 1 y 2). A diferencia de irinotecán, actualmente usado en escenarios clínicos, este compuesto no requiere una activación por una enzima para ejercer un efecto antitumoral. Además, la actividad inhibidora en la topoisomerasa es mayor que SN-38 que es una sustancia farmacéuticamente activa principal de irinotecán y topotecán utilizada también en escenarios clínicos y se obtiene mayor actividad citocida *in vitro* frente a diversas células cancerosas. En particular, presenta efecto contra células cancerosas que tienen resistencia a SN-38 o similar debido a la expresión de la glicoproteína P. Además, en un modelo de ratón trasplantado por vía subcutánea de tumor humano, presentó un potente efecto antitumoral, y por tanto, ha experimentado los estudios clínicos, pero no se ha introducido en el mercado todavía (véanse, Referencias no de patente 5 a 10). Sigue estando poco claro si exatecán actúa o no eficazmente como un ADC.

35 DE-310 es un complejo en el que exatecán está conjugado a un polímero polialcohólico de carboximetildextrano biodegradable mediante un separador peptídico GGFG (Referencia de patente 3 y Referencias no de patente 30 y 31). Los separadores peptídicos incluyendo del tetrapéptido GGFG se describen en la referencia no de patente 32. Convirtiendo exatecán en una forma de profármaco polimérico, Se puede mantener una propiedad de alta retención en sangre y también una propiedad de alta direccionabilidad a un área tumoral de forma pasiva aumentada utilizando la permeabilidad aumentada de recipientes sanguíneos formados recientemente en el tumor y la propiedad de retención en tejidos tumorales. Con DE-310, mediante la escisión del separador peptídico por una enzima, exatecán y exatecán con glicina vinculado a un grupo amino se liberan continuamente como una sustancia activa principal. Como resultado, se mejoran las farmacocinéticas. Se encontró que DE-310 tenía una mayor eficacia que exatecán administrado solo, incluso aunque la cantidad total de exatecán contenida en el anterior sea menor en el caso de administración de exatecán solo de acuerdo con los diversos modelos de evaluación de tumores en estudios no clínicos. Se llevó a cabo un estudio clínico para DE-310 y también se confirmaron casos eficaces, en los que un informe sugiere que la sustancia activa principal se acumula en un tumor en vez de estar presente en tejidos

normales, sin embargo, existe un informe indicando que la acumulación de DE-310 y la sustancia activa principal en un tumor no es muy diferente de la acumulación en tejidos normales en seres humanos, y por tanto no se observa direccionamiento pasivo en seres humanos (véanse, Referencias no de patente 11 a 14). Como resultado, DE-310 no se comercializó también, y sigue estando poco claro si exatecán actúa eficazmente o no como un fármaco dirigido a dicha diana.

Como un compuesto que se refiere a DE-310, se conoce también un complejo en el que un resto estructural representado por  $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$  se inserta entre el separador  $\text{-GGFG-}$  y exatecán para formar  $\text{-GGFG-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$  utilizado como una estructura separadora (Referencia de patente 4). Sin embargo, el efecto antitumoral de dicho complejo no se conoce en absoluto.

TROP2 humano (TACSTD2: transductor 2 de la señal de calcio asociado a tumor, GA733-1, EGP-1, M1S1; en lo sucesivo en el presente documento, denominado hTROP2) es una proteína de membrana celular de tipo 1 transmembrana de un único paso que consiste en 323 restos de aminoácidos. Aunque se ha sugerido previamente la presencia de una proteína de membrana celular implicada en la resistencia inmunitaria, que es común en trofoblastos humanos y células cancerosas (Referencia no de patente 15), se identificó una molécula de antígeno reconocida por un anticuerpo monoclonal (162-25.3 o 162-46.2) contra una proteína de membrana celular en una línea de células de coriocarcinoma humano y se designó TROP2 como una de las moléculas expresadas en trofoblastos humanos (Referencia no de patente 16). Se encontró también posteriormente esta molécula por otros investigadores y se ha designado también como un antígeno tumoral GA733-1 reconocido por anticuerpo monoclonal GA733 de ratón (Referencia no de patente 17) obtenida mediante inmunización con una línea de células de cáncer gástrico o una glicoproteína epitelial (EGP-1; Referencia no de patente 18) reconocido por un anticuerpo monoclonal RS7-3G11 obtenido mediante inmunización con células de cáncer de pulmón no microcítico. En 1995, sin embargo, se clonó el gen TROP2, y se confirmó que todas estas moléculas eran moléculas idénticas (Referencia no de patente 19). La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de hTROP2 están disponibles en una base de datos pública y pueden referirse a, por ejemplo, los números de registro NM\_002353 y NP\_002344 (NCBI).

El gen hTROP2 constituye la familia de genes TACSTD, junto con el gen TROP-1 humano (EpCAM, EGP-2, TACSTD1) que tiene aproximadamente un 50 % de homología (Referencia no de patente 21). La proteína hTROP2 está constituida por una secuencia de señalización que consiste en 26 restos de aminoácidos en el extremo N, un dominio extracelular que consiste en 248 restos de aminoácidos, un dominio transmembrana que consiste en 23 restos de aminoácidos y un dominio intracelular que consiste en 26 restos de aminoácidos. El dominio extracelular tiene cuatro sitios de glicosilación unidos a N y se sabe que tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 10 kD más el valor calculado teórico 35 kD (Referencia no de patente 19).

No se ha identificado ninguno que tenga un ligando fisiológico de hTROP2, ni se han desvelado sus funciones moleculares hasta el momento. Se encontró que hTROP2 transduce las señales del calcio en células tumorales (Referencia no de patente 20). Además, hTROP2 está fosforilada en un resto de serina intracelular 303 por la proteína quinasa C, que es una quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Referencia no de patente 18), y tiene una secuencia de unión a  $\text{PIP}_2$  en el dominio intracelular, que sugiere funciones de señalización en células tumorales (Referencia no de patente 22).

En un análisis inmunohistoquímico utilizando muestras clínicas, se encontró que hTROP2 estaba expresada en exceso en varios carcinomas de células epiteliales y que se expresaba en células epiteliales en tipo limitados de tejidos normales a un nivel de expresión bajo en comparación con tejidos tumorales (Referencias no de patente 23 a 27). Asimismo, se notificó que la expresión de hTROP2 estaba correlacionada con un pronóstico malo del cáncer colorrectal (Referencia no de patente 23), cáncer gástrico (Referencia no de patente 24), cáncer de páncreas (Referencia no de patente 25), cáncer oral (Referencia no de patente 26), y glioma (Referencia no de patente 27).

A partir de modelos que utilizan células de cáncer colorrectal, se notificó además que la expresión de hTROP2 esta implicada en el crecimiento celular independiente de la estructura de las células tumorales y en la tumorigénesis de ratones inmunodeficientes (Referencia no de patente 28).

La Referencia no de patente 29 y la Referencia de patente 10 desvelan conjugados de fármaco-anticuerpo que contienen un anticuerpo anti-TROP2 (hRS7) conjugado con un fármaco (SN-38). La Referencia de patente 13 desvela conjugados de anticuerpos contra EPG-1 (anticuerpos dirigidos contra TROP2), incluyendo el anticuerpo hRS7, con agentes antitumorales, incluyendo camptotecina, para su uso contra el cáncer. La Referencia de patente 14 desvela conjugados adicionales de hRS7 y SN38. La referencia no de patente 6 describe la preparación de camptotecina exatecán (DX-8951) y su utilidad como un agente anticanceroso e indica que es más potente que SN-38.

En respuesta a dicha información sugiriendo la asociación con el cáncer, se ha establecido hasta el momento una pluralidad de anticuerpos dirigidos contra hTROP2 y estudiado para sus efectos antitumorales. Entre estos anticuerpos, se desvela, por ejemplo, un anticuerpo sin conjugar que presenta su propia actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de ratón atímico (Referencias de patente 5 a 8) así como un anticuerpo que presenta actividad antitumoral como ADC con un fármaco citotóxico (Referencias de patente 9 a 12). Sin embargo, la intensidad o cobertura de su actividad es todavía insuficiente, y existen necesidades médicas sin satisfacer para

hTROP2 como una diana terapéutica.

Lista de citas

Referencia de patente

- 5 Referencia de patente 1: patente japonesa abierta a consulta n.º 5-59061  
Referencia de patente 2: patente japonesa abierta a consulta n.º 8-337584  
Referencia de patente 3: publicación internacional n.º WO 1997/46260  
Referencia de patente 4: publicación internacional n.º WO 2000/25825  
Referencia de patente 5: publicación internacional n.º WO 2008/144891  
10 Referencia de patente 6: publicación internacional n.º WO 2011/145744  
Referencia de patente 7: publicación internacional n.º WO 2011/155579  
Referencia de patente 8: publicación internacional n.º WO 2013/077458  
Referencia de patente 9: publicación internacional n.º WO 2003/074566  
Referencia de patente 10: publicación internacional n.º WO 2011/068845  
Referencia de patente 11: publicación internacional n.º WO 2013/068946  
15 Referencia de patente 12: patente de EE.UU. n.º 7999083  
Referencia de patente 13: documento U.S. 2008/131363 A1  
Referencia de patente 14: documento U.S. 2011/293513 A1

Referencia no de patente

- 20 Referencia no de patente 1: Ducry, L., y col., *Bioconjugate Chem.* (2010) 21, 5-13.  
Referencia no de patente 2: Alley, S. C., y col., *Current Opinion in Chemical Biology* (2010) 14, 529-537.  
Referencia no de patente 3: Damle N.K., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2004) 4, 1445-1452.  
Referencia no de patente 4: Senter P. D., y col., *Nature Biotechnology* (2012) 30, 631-637.  
Referencia no de patente 5: Kumazawa, E., Tohgo, A., *Exp. Opin. Invest. Drugs* (1998) 7, 625-632.  
25 Referencia no de patente 6: Mitsui, I., y col., *Jpn J. Cancer Res.* (1995) 86, 776-782.  
Referencia no de patente 7: Takiguchi, S., y col., *Jpn J. Cancer Res.* (1997) 88, 760-769.  
Referencia no de patente 8: Joto, N. y col., *Int J Cancer* (1997) 72, 680-686.  
Referencia no de patente 9: Kumazawa, E. y col., *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1998) 42, 210-220.  
Referencia no de patente 10: De Jager, R., y col., *Ann N Y Acad Sci* (2000) 922, 260-273.  
30 Referencia no de patente 11: Inoue, K. y col., *Polymer Drugs in the Clinical Stage*, Editado por Maeda y col. (2003), 145-153.  
Referencia no de patente 12: Kumazawa, E. y col., *Cancer Sci* (2004) 95, 168-175.  
Referencia no de patente 13: Soepenber, O. y col., *Clinical Cancer Research*, (2005) 11, 703-711.  
Referencia no de patente 14: Wente M. N. y col., *Investigational New Drugs* (2005) 23, 339-347.  
35 Referencia no de patente 15: Faulk WP, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75(4), 1947-1951 (1978).  
Referencia no de patente 16: Lipinski M, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(8), 5147-5150 (1981).  
Referencia no de patente 17: Linnenbach A J, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86(1), 27-31 (1989).  
Referencia no de patente 18: Basu A, y col., *Int. J. Cancer*, 62(4), 472-479 (1995).  
Referencia no de patente 19: Fornaro M, y col., *Int. J. Cancer*, 62(5), 610-618 (1995).  
Referencia no de patente 20: Ripani E, y col., *Int. J. Cancer*, 76(5), 671-676 (1998).  
40 Referencia no de patente 21: Calabrese G, y col., *Cytogenet. Cell Genet.*, 92(1-2), 164-165 (2001).  
Referencia no de patente 22: El Sewedy T, y col., *Int. J. Cancer*, 75(2), 324-330 (1998).  
Referencia no de patente 23: Ohmachi T, y col., *Clin. Cancer Res.*, 12(10), 3057-3063 (2006).  
Referencia no de patente 24: Muhlmann G, y col., *J. Clin. Pathol.*, 62(2), 152-158 (2009).  
Referencia no de patente 25: Fong D, y col., *Br. J. Cancer*, 99(8), 1290-1295 (2008).  
45 Referencia no de patente 26: Fong D, y col., *Mod. Pathol.*, 21(2), 186-191 (2008).  
Referencia no de patente 27: Ning S, y col., *Neurol. Sci.*, 34(10), 1745-1750 (2013).  
Referencia no de patente 28: Wang J, y col., *Mol. Cancer Ther.*, 7(2), 280-285 (2008).  
Referencia no de patente 29: Cardillo T M, y col., *Clin. Cancer Res.*, 17(10); 3157-3169 (2011).  
Referencia no de patente 30: Ochi Y, y col., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 554: 323-332 (2005).  
50 Referencia no de patente 31: Wente M N, y col., *Investigational New Drugs*, 23(4), 339-347 (2005).  
Referencia no de patente 32: Shiose Y, y col., *Bioconjugate Chem.*, 20(1), 60-70 (2009).

## **Sumario de la invención**

### **Problema técnico**

- 55 Con respecto al tratamiento del tumor por un anticuerpo, se puede observar un efecto antitumoral insuficiente incluso cuando el anticuerpo reconoce un antígeno que se une a las células tumorales, y existe un caso en el que se necesita un anticuerpo antitumoral más eficaz. Además, muchos compuestos antitumorales de peso molecular bajo tienen un problema en la seguridad similar a un efecto secundario y la toxicidad incluso cuando los compuestos tienen un excelente efecto antitumoral. Sigue siendo un objeto de la invención conseguir un efecto terapéutico superior potenciar además la seguridad. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es la obtención para

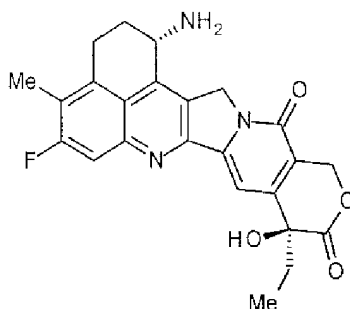
proporcionar un fármaco antitumoral que tenga un excelente efecto terapéutico, que sea excelente en términos de efecto antitumoral y seguridad.

Los inventores piensan que, cuando un compuesto antitumoral exatecán se convierte en conjugado de fármaco-anticuerpo, mediante un resto de la estructura del enlazador, mediante conjugación con el anticuerpo anti-TROP2, que es capaz de dirigirse a células tumorales, es decir, tener una propiedad capaz de reconocer células tumorales, una propiedad capaz de unión a células tumorales, una propiedad de internalizarse en las células tumorales, o similar, se puede adquirir la actividad citocida basada en el anticuerpo, el compuesto antitumoral puede administrarse de forma más segura a las células tumorales para presentar específicamente el efecto antitumoral del compuesto en las células tumorales, y por tanto, el efecto antitumoral puede presentarse de forma segura, y una dosis del compuesto antitumoral se puede reducir en comparación con un caso de administración del compuesto solo, y por tanto, se puede evitar una influencia del compuesto antitumoral en las células normales de tal manera que se puede conseguir una mayor seguridad.

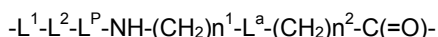
A este respecto, los inventores crearon un enlazador con una estructura específica y tuvieron éxito en obtener un conjugado de fármaco anticuerpo en el que el anticuerpo anti-TROP2 y exatecán se conjugan entre sí mediante un enlazador, y confirmaron un excelente efecto antitumoral presentado por el conjugado para completar por tanto la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente.

[1] Un conjugado de fármaco-anticuerpo en el que un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula:

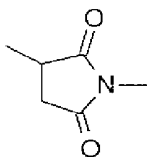


se conjuga con un anticuerpo anti-TROP2 mediante un enlace tioéter que se forma en un resto de enlace disulfuro presente en una parte de la bisagra del anticuerpo anti-TROP2 mediante un enlazador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



en la que el anticuerpo anti-TROP2 se une al extremo de  $L^1$ , el compuesto antitumoral se une al grupo carbonilo del resto  $-(CH_2)n^2-C(=O)-$  con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como la posición de unión, en la que

$n^1$  representa un entero de 0 a 6,  
 $n^2$  representa un entero de 0 a 5,  
 $L^1$  representa  $-(\text{Succinimid-3-il-N})-(CH_2)n^3-C(=O)-$ ,  
 en la que  $n^3$  representa un entero de 2 a 8,  
 $L^2$  representa  $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$  o un enlace sencillo,  
 en la que  $n^4$  representa un entero de 1 a 6,  
 $L^P$  representa un resto tetrapéptido de  $-GGFG-$ ,  
 $L^a$  representa  $-O-$  o un enlace sencillo, y  
 $-(\text{Succinimid-3-il-N})-$  tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

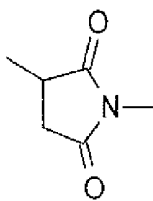


que se une al anticuerpo contra TROP2 en la posición 3 del mismo y se une a un grupo metileno en la estructura del enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1, en la que el anticuerpo anti-TROP2 comprende CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 en su región variable de la cadena pesada y CDRL1 que

consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 en su región variable de la cadena ligera.

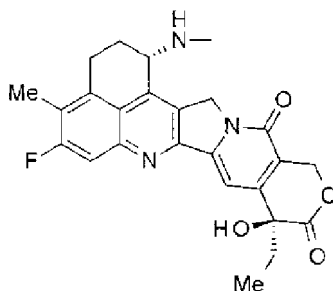
[2] El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con [1], en el que el resto de la estructura enlazador-fármaco que tiene un fármaco unido a  $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_n^1-L^a-(CH_2)_n^2-C(=O)-$  es una estructura de enlazador fármaco seleccionada entre el siguiente grupo:

- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
  - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
  - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
  - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
  - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
  - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
  - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
  - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
  - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
  - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), y
  - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX);
- en el que -(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



que se une al anticuerpo contra TROP2 en la posición 3 del mismo y se une a un grupo metileno en la estructura del enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1,

- (NH-DX) representa un grupo representado por la siguiente fórmula:



en el que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 está en una posición de unión, y

- GGFG- representa un resto tetrapéptido de -Gly-Gly-Phe-Gly-.

[3] El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con [2], en el que el resto de la estructura de enlazador-fármaco es una estructura de enlazador fármaco seleccionada entre el siguiente grupo:

- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), y
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

[4] El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con [3], en el que el resto de la estructura de enlazador-fármaco es:

- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

[5] El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con [3], en el que el resto de la estructura de enlazador-

fármaco es:

- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

[6] El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con [3], en el que el resto de la estructura de enlazador-fármaco es:

5 - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

[7] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], en el que el anticuerpo anti-TROP2 comprende una cadena pesada y una cadena ligera seleccionada entre el grupo;

10 una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 140 de la SEQ ID NO: 12 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 129 de la SEQ ID NO:18,

una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 20 a 140 de la SEQ ID NO: 14 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 129 de la SEQ ID NO:18,

15 Una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 140 de la SEQ ID NO: 14 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 129 de la SEQ ID NO: 20, y una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 140 de la SEQ ID NO: 16 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 129 de la SEQ ID NO: 22.

20 [8] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], en el que el anticuerpo anti-TROP2 comprende una cadena pesada y una cadena ligera seleccionada entre el grupo; una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 470 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 de la SEQ ID NO: 18,

25 una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 470 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 de la SEQ ID NO: 18,

30 una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 470 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 de la SEQ ID NO: 20, y

una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 470 de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 de la SEQ ID NO: 22.

35 [9] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], en el que el anticuerpo anti-TROP2 comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 140 de la SEQ ID NO: 12 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 129 de la SEQ ID NO: 18.

40 [10] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], en el que el anticuerpo anti-TROP2 comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 470 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 de la SEQ ID NO: 18.

[11] El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con [8], en el que el anticuerpo anti-TROP2 carece de un resto de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada.

45 [12] El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con [10], en el que el anticuerpo anti-TROP2 carece de un resto de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada.

[13] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [12], en el que un número promedio de unidades de la estructura de enlazador-fármaco seleccionada conjugada por anticuerpo está en un intervalo de entre 2 a 8.

50 [14] El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [12], en el que un número promedio de unidades de la estructura de enlazador fármaco seleccionada conjugada por anticuerpo está en un intervalo de entre 3 a 8.

[15] Un fármaco que contiene el conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [14], una sal del mismo, o un hidrato del mismo.

55 [16] Un fármaco antitumoral y/o un fármaco anticanceroso que contiene el conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [14], una sal del mismo, o un hidrato del mismo.

[17] El fármaco antitumoral y/o el fármaco anticanceroso de acuerdo con [16], para su uso en un método de tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de cuello de útero, cáncer de cabeza y cáncer de cuello, o cáncer de esófago.

60 [18] Una composición farmacéutica que contiene el conjugado de fármaco-anticuerpo que contiene el conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [14], una sal del mismo, o un hidrato del mismo como un componente activo, y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.

[19] La composición farmacéutica de acuerdo con [18], para su uso en un método de tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de cuello de útero, cáncer de cabeza y cáncer de cuello, o cáncer de esófago.

## 5 **Efectos ventajosos de la invención**

Con un conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 que tiene un compuesto antitumoral exatecán conjugado mediante un enlazador con una estructura específica, se puede conseguir un excelente efecto y seguridad antitumorales.

### **Breve descripción de los dibujos**

- 10 [Figura 1] La Figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:7) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:8) de la cadena pesada de un anticuerpo cTINA1.  
 [Figura 2] La Figura 2 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:9) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:10) de la cadena ligera del anticuerpo cTINA1.
- 15 [Figura 3] La Figura 3 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:11) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:12) de la cadena pesada de un hTINA1-H1.  
 [Figura 4] La Figura 4 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:13) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:14) de la cadena pesada de un hTINA1-H2.  
 [Figura 5] La Figura 5 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:15) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:16) de la cadena pesada de un hTINA1-H3.
- 20 [Figura 6] La Figura 6 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:17) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:18) de la cadena ligera de un hTINA1-L1.  
 [Figura 7] La Figura 7 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:19) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:20) de la cadena ligera de un hTINA1-L2.  
 [Figura 8] La Figura 8 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:21) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:22) de la cadena ligera de un hTINA1-L3.
- 25 [Figura 9] La Figura 9 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 23) de CDRH1 de un anticuerpo TINA1, una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 24) del mismo CDRH2, una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 25) del mismo CDRH3, una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 26) del mismo CDRL1, una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 27) del mismo CDRL2, y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 28) del mismo CDRL3.
- 30 [Figura 10] La Figura 10 muestra la capacidad de internalización celular de un anticuerpo anti-CD9, un anticuerpo anti-CD46, un anticuerpo anti-CD55, un anticuerpo anti-CD59, un anticuerpo anti-CD71, un anticuerpo anti-CD73, un anticuerpo anti-CD147, un anticuerpo anti-CD276, un anticuerpo anti-EpCAM, un anticuerpo anti-EGFR, y un anticuerpo anti-TROP2 (anticuerpo TINA1).
- 35 [Figura 11] La Figura 11 muestra la capacidad de internalización celular de un anticuerpo anti-CD59, un anticuerpo anti-CD71, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EpCAM, y un anticuerpo anti-TROP2 (anticuerpo TINA1).  
 [Figura 12] La Figura 12 muestra la capacidad de internalización celular de diversos anticuerpos dirigidos contra TROP2.
- 40 [Figura 13] La Figura 13 muestra el efecto antitumoral de un conjugado de fármaco-anticuerpo (1), (6), o (12) sobre una línea de células COLO205 de cáncer colorrectal humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.  
 [Figura 14] La Figura 14 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (1), (6), o (12) sobre una línea de células BxPC-3 de adenocarcinoma de páncreas humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.
- 45 [Figura 15] La Figura 15 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (1), (6), o (12) sobre una línea de células Capan-1 de adenocarcinoma de páncreas humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.  
 [Figura 16] La Figura 16 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (2), (5), (7), o (10) sobre una línea de células COLO205 de cáncer colorrectal humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.
- 50 [Figura 17] La Figura 17 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (2), (5), (7), o (10) sobre una línea de células BxPC-3 de adenocarcinoma de páncreas humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.  
 [Figura 18] La Figura 18 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) sobre una línea de células COLO205 de cáncer colorrectal humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.
- 55 [Figura 19] La Figura 19 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) sobre una línea de células BxPC-3 de adenocarcinoma de páncreas humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.  
 [Figura 20] La Figura 20 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) sobre una línea de células NIH: OVCAR-3 de cáncer ovárico humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.
- 60



[Figura 21] La Figura 21 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) sobre una línea de células NCI-N87 de cáncer gástrico humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.

5 [Figura 22] La Figura 22 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) sobre una línea de células NCI-H292 de cáncer pulmón humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.

[Figura 23] La Figura 23 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) sobre una línea de células FaDu de cáncer de garganta humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.

10 [Figura 24] La Figura 24 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) sobre una línea de células CFPAC-1 de adenocarcinoma de páncreas humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.

15 [Figura 25] La Figura 25 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (8) o (13) sobre una línea de células CFPAC-1 de adenocarcinoma de páncreas humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.

[Figura 26] La Figura 26 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (8) o (13) sobre una línea de células HPAC de adenocarcinoma de páncreas humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB/c-nu/nu.

20 [Figura 27] La Figura 27 muestra el efecto antitumoral del conjugado de fármaco-anticuerpo (8) o (13) sobre una línea de tejidos de cáncer de esófago humano trasplantada por vía subcutánea en ratones BALB-nu/nu.

### **Descripción de las realizaciones**

En lo sucesivo en el presente documento, se describirán los modos preferidos de llevar a cabo la presente invención con referencia a los dibujos. Las realizaciones descritas a continuación se proporcionan como ejemplos típicos y no se pretende que limiten el ámbito de la presente invención.

25 El conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención es un fármaco antitumoral en el que un anticuerpo anti-TROP2 se conjuga con un compuesto antitumoral mediante un resto de estructura del enlazador y se explica en detalle a continuación en el presente documento.

[Anticuerpo]

30 El anticuerpo anti-TROP2 utilizado en el conjugado de fármaco anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención puede derivarse de cualquier especie, y los ejemplos preferidos de especies pueden incluir seres humanos, ratas, ratones, y conejos. en el caso cuando se derivan de especies diferentes a la humana, resulta preferente quimerizarlos o humanizarlos usando una técnica bien conocida. El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal y es preferentemente un anticuerpo monoclonal.

35 El anticuerpo anti-TROP2 es capaz de dirigirse a células tumorales, es decir, tiene la propiedad capaz de reconocer una célula tumoral, la propiedad capaz de unirse a células tumorales, la propiedad de internalizarse en una célula tumoral, o similar, y puede convertirse en un conjugado de fármaco-anticuerpo mediante conjugación con un compuesto que tiene actividad antitumoral mediante un enlazador.

40 La actividad de unión del anticuerpo contra las células tumorales puede confirmarse usando citometría de flujo. Los ejemplos del método para confirmar la internalización del anticuerpo en células tumorales pueden incluir (1) un ensayo para visualizar un anticuerpo incorporado en células con un microscopio de fluorescencia utilizando la unión de un anticuerpo secundario (marcado fluorescentemente) al anticuerpo terapéutico (Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761), (2) un ensayo para medir la intensidad de la fluorescencia incorporada a las células utilizando la unión de un anticuerpo secundario (marcado fluorescentemente) al anticuerpo terapéutico (Molecular Biology of the Cell, Vol. 15, 5268-5282, diciembre de 2004), o (3) un ensayo Mab-ZAP que utiliza la unión de una inmunotoxina al anticuerpo terapéutico en el que se libera la toxina tras la incorporación en células para inhibir el crecimiento celular (Bio Techniques 28: 162-165, Enero de 2000). Una proteína compleja recombinante de una región catalítica de la toxina de la difteria y la proteína G pueden utilizarse como la inmunotoxina.

50 Debido a que el fármaco conjugado en el conjugado de fármaco-anticuerpo ejerce un efecto antitumoral, se prefiere, pero no es esencial que el propio anticuerpo deba tener un efecto antitumoral. A fines de ejercer específica y selectivamente la actividad citocida del compuesto antitumoral sobre células tumorales, es importante, y se prefiere también que el anticuerpo deba tener la propiedad de internalizarse para migrar en las células tumorales.

55 El anticuerpo anti-TROP2 puede obtenerse usando un método llevado a cabo usualmente en la técnica, que implica inmunizar animales con un polipéptido antigénico y recoger y purificar los anticuerpos producidos *in vivo*. El origen del antígeno no está limitado a los seres humanos, y se pueden inmunizar los animales con un antígeno derivado de un animal no humano tal como un ratón, una rata y similares. En este caso, la reactividad cruzada de la unión de los anticuerpos al antígeno heterólogo obtenido con antígenos humanos puede ensayarse para cribar un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

Como alternativa, las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos contra el antígeno se fusionan

con células de mieloma de acuerdo con un método conocido en la materia (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature (1975) 256, págs. 495-497; y Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, págs. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)) para establecer hibridomas, a partir de los cuales se pueden obtener a su vez anticuerpos monoclonales.

5 El antígeno puede obtenerse mediante células hospedadoras diseñadas mediante ingeniería genética para producir un gen que codifica la proteína antigénica. Específicamente, Se preparan vectores que permiten la expresión del antígeno y se transfieren a células hospedadoras de tal manera que se exprese el gen. El antígeno preparado de esta manera se puede purificar. Se puede obtener también el anticuerpo utilizando un método de inmunizar animales con las células que expresan el antígeno diseñadas mediante ingeniería genética descritas anteriormente o una línea de células que expresa en antígeno.

10 El anticuerpo anti-TROP2 puede obtenerse mediante un procedimiento conocido en la técnica.

El anticuerpo anti-TROP2 que se puede usar en la presente invención no está particularmente limitado, y, por ejemplo, se pueden usar preferentemente aquellos especificados por las secuencias de aminoácidos que se muestran en el Listado de secuencias de la presente solicitud. El anticuerpo anti-TROP2 utilizado en la presente invención tiene preferentemente propiedades como se describe a continuación.

15 (1) Un anticuerpo que tiene las siguientes propiedades:

- (a) unirse específicamente a TROP2, y
- (b) tener una actividad de internalizarse en células que expresan TROP2 mediante la unión a TROP2.

(2) El anticuerpo de acuerdo con (1), en el que TROP2 es TROP2 humano.

20 (3) El anticuerpo de acuerdo con (1) o (2), en el que el anticuerpo tiene una CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 23, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 24, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 25 como regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada, y CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 26, CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 27, y CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 28 como regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera.

25 (4) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), en el que la región constante del mismo es una región constante derivada de ser humano.

(5) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

30 (6) El anticuerpo de acuerdo con (5), en el que el anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácido 20 a 140 en la SEQ ID NO: 12, (b) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 en la SEQ ID NO: 14, (c) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 en la SEQ ID NO: 16, (d) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % o más de homología con cualquiera de las secuencias (a) a (c), y (e) una secuencia de aminoácidos derivada de cualquiera de las secuencias (a) a (c) mediante las deleciones, sustituciones, o adiciones de al menos un aminoácido, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en (f) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 en la SEQ ID NO: 18, (g) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 en la SEQ ID NO: 20, (h) una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 en la SEQ ID NO: 22, (i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % o más de homología con cualquiera de las secuencias (f) a (h), y (j) una secuencia de aminoácidos derivada de cualquiera de las secuencias (f) a (h) mediante las deleciones, sustituciones, o adiciones de al menos un aminoácido.

35 (7) El anticuerpo de acuerdo con (6), en el que el anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera seleccionada entre el grupo que consiste en una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 12 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO: 18, una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 12 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO: 20, una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 12 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO: 22, una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 14 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO: 18, una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 14 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO: 20, una región variable de la cadena pesada que



aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 18, una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 22.

(11) El anticuerpo de acuerdo con (8), en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera seleccionadas entre el grupo que consiste en una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 20 a 470 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 18, una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 20 a 470 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 20, y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en las posiciones de aminoácidos 20 a 470 de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de la SEQ ID NO: 22.

(12) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (11), en el que el anticuerpo carece de un resto de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada.

(13) Un anticuerpo obtenido mediante un método para producir el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (12), comprendiendo el método las etapas de: cultivar una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo; y recoger el anticuerpo de interés a partir de los cultivos obtenidos en la etapa anterior.

En lo sucesivo en el presente documento, se describe el anticuerpo anti-TROP2 utilizado en la invención.

Los términos "cáncer" y "tumor" como se usan en el presente documento se utilizan con el mismo significado.

El término "gen" como se usa en el presente documento incluye no solo ADN, sino también el ARNm del mismo, el ADNc del mismo, y el ARNc del mismo.

El término "polinucleótido" como se usa en el presente documento se utiliza con el mismo significado que un ácido nucleico e incluye también ADN, ARN, sondas, oligonucleótidos, y cebadores.

Los términos "polipéptido" y "proteína" como se usa en el presente documento se usan sin distinción.

El término "célula" como se usa en el presente documento incluyen también células de un individuo animal y células cultivadas.

El término "TROP2" como se usa en el presente documento se utiliza con el mismo significado que la proteína TROP2.

El término "CDR", como se usa en el presente documento, se refiere a una región determinante de la complementariedad (CDR). Se sabe que la cadena pesada y la cadena ligera de una molécula de anticuerpo tiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La CDR se denomina también el dominio hipervariable, y está presente en una región variable de cada cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo. Es un sitio que tiene de forma inusual una alta variabilidad en su estructura primaria, y existen tres CDR separadas en la estructura primaria de cada cadena polipeptídica pesada y ligera. En la presente memoria descriptiva, como para las CDR de un anticuerpo, las CDR de la cadena pesada se representan por CDRH1, CDRH2, y CDRH3 desde el lado del extremo amino de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, y las CDR de la cadena ligera se representan por CDRL1, CDRL2, y CDRL3 desde el lado del extremo amino de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera. Estos sitios están próximos entre sí en la estructura terciaria y determinan la especificidad por un antígeno al cual se une el anticuerpo.

La frase "la hibridación se lleva a cabo en condiciones restrictivas" como se usa en el presente documento se refiere a un proceso en el que se lleva a cabo en condiciones bajo las cuales se puede conseguir la identificación llevando a cabo la hibridación a 68 °C en una solución de hibridación comercialmente disponible, ExpressHyb Hybridization Solution (fabricada por Clontech, Inc.) o llevando a cabo la hibridación a 68 °C en presencia de 0,7 a 1,0 M de NaCl utilizando un filtro que tiene un ADN inmovilizado en el mismo, seguido por llevar a cabo el lavado a 68 °C usando una solución de 0,1 a 2 x SSC (1 x SSC está compuesta por NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM) o en condiciones equivalentes a las anteriores.

## 1. TROP2

TROP2 es un miembro de la familia TACSTD expresada en trofoblastos humanos y es una proteína de membrana celular de tipo 1 transmembrana de un único paso implicada en la resistencia inmunitaria, que es común a los trofoblastos humanos y a las células cancerosas.

Como para la proteína TROP2 que se va a usar en la invención, la proteína TROP2 puede purificarse directamente a partir de células que expresan TROP2 de un mamífero humano o un mamífero no humano (tal como una rata o un ratón) y utilizarse, o se puede preparar y usar una fracción de membrana celular de las células anteriormente descritas. Además, se puede obtener TROP2 mediante síntesis *in vitro* de la misma o producción de la misma en una célula hospedadora mediante ingeniería genética. En la ingeniería genética, específicamente, después de que el ADNc de TROP2 se integra en un vector capaz de expresar ADNc de TROP2, la proteína TROP2 puede obtenerse sintetizando esta en una solución que contiene una enzima, un sustrato y una sustancia energética requerida para la transcripción y la traducción, o expresando TROP2 en otra célula hospedadora transformada procariota o eucariota. Como alternativa, las células que expresan TROP2 diseñadas mediante ingeniería genética descritas anteriormente o una línea de células que expresan TROP2 se puede usar como la proteína TROP2.

La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de TROP2 están disponibles en una base de datos pública y pueden referirse a, por ejemplo, los números de registro NM\_002353 y NP\_002344 (NCBI).

Además, se incluye también en TROP2 una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos se sustituyen, eliminan y/o añaden en cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriormente descritas de TROP2 y también tiene una actividad biológica equivalente a la de la proteína.

La proteína TROP2 humana está constituida por una secuencia de señalización que consiste en 26 restos de aminoácidos en el extremo N, un dominio extracelular que consiste en 248 restos de aminoácidos, un dominio transmembrana que consiste en 23 restos de aminoácidos y un dominio intracelular que consiste en 26 restos de aminoácidos.

## 2. Producción de anticuerpo anti-TROP2

El anticuerpo anti-TROP2 de la invención se puede obtener usando un método llevado a cabo usualmente en la técnica, que implica inmunizar un animal con TROP2 o un polipéptido arbitrario seleccionado entre la secuencia de aminoácidos de TROP2 y recoger y purificar el anticuerpo producido *in vivo*. La especie biológica de TROP2 que se va a utilizar como un antígeno no está limitada al ser humano, y se puede inmunizar un animal con TROP2 derivada de un animal diferente de los seres humanos tal como un ratón o una rata. En este caso, examinando la reactividad cruzada entre la unión de un anticuerpo a TROP2 heteróloga obtenido y TROP2 humana, se puede seleccionar un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

Además, se puede obtener un anticuerpo monoclonal a partir de un hibridoma establecido fusionando las células productoras de anticuerpos que producen un anticuerpo contra TROP2 con células de mieloma de acuerdo con un método conocido (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, (1975) 256, páginas. 495-497; Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, páginas. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)).

Se puede obtener TROP2 que se va a utilizar como un antígeno expresando el gen TROP2 en una célula hospedadora utilizando ingeniería genética.

Específicamente, se produce un vector capaz de expresar el gen TROP2, y el vector resultante se transfecta en una célula hospedadora para expresar el gen, y a continuación, el TROP2 expresado se purifica.

Como alternativa, las células que expresan TROP2 diseñadas mediante ingeniería genética descritas anteriormente o una línea de células que expresan TROP2 se puede usar como la proteína TROP2. En lo sucesivo en el presente documento, se describe específicamente un método de obtener un anticuerpo contra TROP2.

### (1) Preparación del antígeno

Los ejemplos del antígeno que se va a usar para producir el anticuerpo anti-TROP2 incluyen TROP2, o un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos parcial que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de TROP2, o un derivado obtenido añadiendo una secuencia de aminoácidos dada o un transportador de la misma.

TROP2 se puede purificar directamente a partir de tejidos tumorales o células tumorales humanas y utilizarse. Además, se puede obtener TROP2 sintetizando esta *in vitro* o produciendo esta en una célula hospedadora mediante ingeniería genética.

Con respecto a la ingeniería genética, específicamente, después de que el ADNc de TROP2 se integra en un vector capaz de expresar ADNc de TROP2, se puede obtener el antígeno sintetizando este en una solución que contiene una enzima, un sustrato y una sustancia energética requerida para la transcripción y la traducción, o expresando TROP2 en otra célula hospedadora transformada procariota o eucariota.

Además, se puede obtener también el antígeno como una proteína secretora expresando una proteína de fusión obtenida ligando el dominio extracelular de TROP2, que es una proteína de membrana, a la región constante de un anticuerpo en un sistema de vector hospedador adecuado.

Se puede obtener el ADNc de TROP2 mediante, por ejemplo, un método de la PCR así denominado en el que una

reacción en cadena de la polimerasa (denominada en lo sucesivo en el presente documento "PCR"; véase Saiki, R. K., y col., Science, (1988) 239, págs. 487-489) se lleva a cabo utilizando una biblioteca de ADNc que expresa el ADNc de TROP2 como un molde y cebadores que amplifican específicamente el ADNc de TROP2.

5 Como la síntesis *in vitro* del polipéptido, por ejemplo, puede ilustrarse el Sistema de Traducción Rápida (RTS) fabricado por Roche Diagnostics, Inc., pero no se limita a los mismos.

10 Los ejemplos de células hospedadoras procariotas incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. A fin de transformar las células hospedadoras con un gen diana, las células hospedadoras se transforman mediante un vector plásmido que comprende un replicón, es decir, un origen de replicación derivado de una especie compatible con el hospedador, y una secuencia reguladora. Además, el vector tiene preferentemente una secuencia capaz de imponer selectividad fenotípica sobre la célula transformada.

15 Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas incluyen células de vertebrados, células de insectos y células de levaduras. como las células de vertebrados, por ejemplo, células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, páginas. 175-182, ATCC CRL-1650; ATCC: American Type Culture Collection), fibroblastos NIH3T3 de murino (ATCC n.º CRL-1658), y cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) de células de ovario de hámster chino (células CHO; ATCC: CCL-61); y se utilizan a menudo las similares, sin embargo, las células no se limitan las anteriores.

El transformante obtenido de esta manera puede cultivarse de acuerdo con un método llevado a cabo usualmente en la técnica, y cultivando el transformante, se produce un polipéptido diana intracelular o extracelularmente.

20 Se puede seleccionar un medio adecuado que se va a utilizar para el cultivo por los expertos en la materia a partir de diversos medios de cultivo utilizados comúnmente dependiendo de las células hospedadoras empleadas. Si se emplea *Escherichia coli*, por ejemplo, se puede usar un medio LB suplementado con un antibiótico tal como ampicilina o IPMG según sea necesario.

25 Se puede separar una proteína recombinante producida intracelular o extracelularmente por el transformante a través de dicho cultivo y purificarse mediante cualquiera de los diversos métodos de separación conocidos utilizando la propiedad física o química de la proteína.

Los ejemplos específicos de los métodos incluyen el tratamiento con un precipitante de proteína común, ultrafiltración, diversos tipos de cromatografía líquida tales como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de afinidad, diálisis, y una combinación de los mismos.

30 Además, uniendo una etiqueta de seis restos de histidina a la proteína recombinante que se va a expresar, la proteína puede purificarse eficazmente con una columna de afinidad de níquel. Como alternativa, uniendo la región Fc de IgG a la proteína recombinante que se va a expresar, la proteína puede purificarse eficazmente con una columna de proteína A.

35 Combinando los métodos anteriormente descritos, se puede producir fácilmente una gran cantidad de polipéptido diana con alto rendimiento y pureza elevada.

40 El propio transformante anteriormente descrito se puede usar también como el antígeno. Como alternativa, se puede usar una línea de células que expresa TROP2 como el antígeno. Los ejemplos de dicha línea de células pueden incluir las líneas NCI-H322, PC14, NCIH-H2122 y LCAM1 de cáncer de pulmón humano, una línea PC3 de cáncer de próstata humano, líneas BxPC-3 de cáncer de páncreas humano, Capan-1, y PK-1, una línea SKOV3 de cáncer de ovarios humano y una línea COLO205 de cáncer colorrectal humano, aunque la línea de células de acuerdo con la presente invención no está limitada a estas líneas de células siempre que exprese TROP2.

## (2) Producción de anticuerpo monoclonal anti-TROP2

Los ejemplos del anticuerpo que se une específicamente a TROP2 incluyen un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a TROP2 y un método para obtener dicho anticuerpo es como se describe a continuación.

45 La producción de un anticuerpo monoclonal requiere generalmente las siguientes etapas operativas de:

- (a) purificar un biopolímero que se va a usar como un antígeno, o preparar las células que expresan el antígeno;
- (b) preparar las células productoras de anticuerpos inmunizando un animal mediante la inyección del antígeno, recoger la sangre, evaluar su título de anticuerpos para determinar cuándo se extirpa el bazo;
- (c) Preparación de células de mieloma (en lo sucesivo denominadas como "mieloma");
- 50 (d) fusionar las células productoras de anticuerpos con el mieloma;
- (e) cribar un grupo de hibridomas produciendo un anticuerpo deseado;
- (f) dividir los hibridomas en clones de células individuales (clonación);
- (g) opcionalmente, cultivar el hibridoma o criar un animal al que se ha implantado el hibridoma para producir una gran cantidad de anticuerpos monoclonales;

(h) examinar el anticuerpo monoclonal producido de esta manera para la actividad biológica y la especificidad de unión, o evaluar el mismo para las propiedades como un reactivo marcado; y similares.

5 En lo sucesivo en el presente documento, el método de producir un anticuerpo monoclonal se describirá en detalle tras las anteriores etapas, sin embargo, el método no está limitado a lo anterior, y, por ejemplo, se pueden usar células productoras de anticuerpos diferentes de las células de bazo y mieloma.

(a) Purificación del antígeno

Como antígeno, se puede usar TROP 2 preparado mediante el método que se describe anteriormente o un péptido parcial del mismo.

10 Además, una fracción de membrana preparada a partir de células recombinantes que expresan TROP2 o las propias células recombinantes que expresan TROP2, y también un péptido parcial de la proteína de la invención sintetizado químicamente mediante un método conocido por los expertos en la materia se puede usar también como el antígeno.

Además, se puede usar una línea de células que expresa TROP2 como el antígeno.

(b) Preparación de las células productoras de anticuerpos

15 El antígeno obtenido en la etapa (a) se mezcla con un adyuvante tal como adyuvante o agente auxiliar completo o incompleto de Freund tal como sulfato de aluminio potasio y la mezcla resultante se usó como un inmunógeno para inmunizar un animal experimental. En un método alternativo, el animal experimental se inmunizan con células que expresan antígenos como un inmunógeno. Como animal experimental, se puede usar sin impedimentos cualquier animal utilizado en un método de producción de hibridoma conocido. Específicamente, por ejemplo, se puede usar  
20 un ratón, una rata, una cabra, oveja, ganado bovino, un caballo, similar. Sin embargo, desde el punto de vista de la facilidad de biodisponibilidad de las células de mieloma que se van a fusionar con las células productoras de anticuerpos extraídas, se usa preferentemente un ratón o una rata como el animal que se va a inmunizar.

25 Además, la cepa de ratón o rata que se va a utilizar no está particularmente limitada, y en el caso de un ratón, por ejemplo, varias cepas tales como A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, y 129 y similares se pueden usar, y en el caso de una rata, por ejemplo, se pueden usar Wistar, Low, Lewis, Sprague, Dawley, ACI, BN, Fischer y similares.

Estos ratones y ratas se pueden obtener de criadores/distribuidores de animales experimentales, por ejemplo, CLEA Japan, Inc. y Charles River Laboratories Japan, Inc.

30 Teniendo en cuenta la compatibilidad para la fusión con las células de mieloma descritas a continuación, en el caso de un ratón, la variedad BALB/c, y en el caso de una rata, las variedades Wistar y Low se prefieren particularmente como el animal que se va a inmunizar.

Además, teniendo en cuenta la homología antigénica entre seres humanos y ratones, se prefiere usar un ratón que tenga la función biológica disminuida para eliminar autoanticuerpos, es decir, un ratón con una enfermedad autoinmunitaria.

35 La edad de dicho ratón o rata en el momento de la inmunización es preferentemente de 5 a 12 semanas de edad, más preferentemente de 6 a 8 semanas de edad.

40 A fin de inmunizar un animal con TROP2 o un recombinante del mismo, se puede usar, por ejemplo, un método conocido descrito en detalle en, por ejemplo, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) o similares.

Entre estos métodos de inmunización, un método específico preferido en la presente invención es, por ejemplo, del siguiente modo.

45 Es decir, en primer lugar, una fracción de proteína de membrana que sirve como el antígeno o las células producidas para expresar el antígeno se administra(n) intradérmica o intraperitonealmente a un animal. Sin embargo, se prefiere la combinación de ambas rutas de administración para aumentar la eficacia de la inmunización, y cuando se lleva a cabo la administración intradérmica en la primera mitad y se lleva a cabo la administración intraperitoneal en la última mitad o solo en la última dosificación, puede aumentarse particularmente la eficacia de la inmunización.

50 El calendario de administración del antígeno varía dependiendo del tipo de animal que se va a inmunizar, las diferencias individuales o similares. Sin embargo, en general, se prefiere un calendario de administración en el que la frecuencia de administración del antígeno sea de 3 a 6 veces y el intervalo de dosificación sea de 2 a 6 semanas, y se prefiere más un calendario de administración en el que la frecuencia de administración del antígeno sea de 3 a 4 veces y el intervalo de dosificación sea de 2 a 4 semanas.

Además, la dosis del antígeno varía dependiendo del tipo de animal, las diferencias individuales o similares, sin embargo, la dosis se ajusta generalmente de 0,05 a 5 mg, preferentemente aproximadamente 0,1 a 0,5 mg.

5 Se lleva a cabo una inmunización de refuerzo de 1 a 6 semanas, preferentemente de 1 a 4 semanas, más preferentemente de 1 a 3 semanas después de la administración del antígeno, como se ha descrito anteriormente. Cuando el inmunógeno son las células, se emplean  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células.

La dosis del antígeno en el momento de llevar a cabo la inmunización de refuerzo varía dependiendo del tipo o tamaño del animal o similar, sin embargo, en el caso de, por ejemplo, un ratón, la dosis se ajusta generalmente de 0,05 a 5 mg, preferentemente 0,1 a 0,5 mg, más preferentemente aproximadamente 0,1 a 0,2 mg. Cuando el inmunógeno son células, se emplean  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células.

10 Los esplenocitos o linfocitos que incluyen las células productoras de anticuerpos se eliminan asépticamente del animal inmunizado después de 1 a 10 días, preferentemente de 2 a 5 días, más preferentemente de 2 a 3 días desde la inmunización de refuerzo. En este momento, se mide el título de anticuerpos, y si un animal que tiene un título de anticuerpos suficientemente aumentado se usa como una fuente de suministro de las células productoras de anticuerpos, el procedimiento posterior se puede llevar a cabo más eficazmente.

15 Los ejemplos de métodos de medición del título de anticuerpos que se va a usar aquí incluyen un método RIA y un método ELISA, pero el método no se limita a lo anterior. Por ejemplo, si se emplea un método ELISA, la medición del título de anticuerpos en la invención se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos que se describen a continuación.

20 En primer lugar, un antígeno purificado o parcialmente purificado se adsorbe en la superficie de una fase sólida tal como una placa de 96 pocillos para ELISA, y la superficie de la fase sólida que no tiene antígeno adsorbido a la misma se cubre con una proteína no relacionada con el antígeno tal como albúmina de suero bovino (BSA). Tras lavar la superficie, la superficie se pone en contacto con una muestra diluida en serie (por ejemplo, suero de ratón) como un anticuerpo primario para permitir que el anticuerpo en la mezcla se una al antígeno.

25 Además, como anticuerpo secundario, se añade un anticuerpo marcado con una enzima contra un anticuerpo de ratón y se deja que se una al anticuerpo de ratón. Después del lavado, se añade un sustrato para la enzima y se mide un cambio en la absorbancia que se produce debido al desarrollo del color inducido por la degradación del sustrato o similar y se calcula el título de anticuerpos basándose en la medición.

30 La separación de las células productoras de anticuerpos de los esplenocitos o linfocitos del animal inmunizado se puede llevar a cabo de acuerdo con un método conocido (por ejemplo, Kohler y col., Nature (1975), 256, pág. 495; Kohler y col., Eur. J. Immunol. (1977), 6, pág. 511; Millstein y col., Nature (1977), 266, pág. 550; Walsh, Nature (1977), 266, pág. 495). Por ejemplo, en el caso de esplenocitos, se puede emplear un método general en el que se separan las células productoras de anticuerpos homogeneizando el bazo para obtener las células mediante filtración con una malla de acero inoxidable y suspendiendo las células en Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM).

(c) Preparación de células de mieloma (en lo sucesivo denominadas "mieloma")

35 Las células de mieloma que se van a usar para la fusión celular no están particularmente limitadas y se pueden seleccionar células adecuadas a partir de líneas de células conocidas. Sin embargo, teniendo en cuenta la conveniencia cuando se selecciona un hibridoma a partir de células fusionadas, se prefiere usar una cepa deficiente en HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa) cuyo procedimiento de selección se ha establecido.

40 Más específicamente, los ejemplos de la cepa deficiente en HGPRT incluyen X63-Ag8(X63), NS1-ANS1(NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), FO, S149/5XXO, y BU.1 derivadas de ratones; 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3) derivadas de ratas; y U266AR(SKO-007), GM1500 GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) y 8226AR/NIP4-1(NP41) derivadas de seres humanos. Estas cepas deficientes en HGPRT están disponibles de, por ejemplo, la ATCC o similares.

45 Estas cepas celulares se subcultivan en un medio apropiado tal como un medio de 8-azaguanina (medio obtenido añadiendo 8-azaguanina a un medio RPMI 1640 suplementado con glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina y suero de feto de ternera (en lo sucesivo denominado "FBS")), medio de Dulbecco modificado por Iscove (en lo sucesivo denominado "IMDM"), o medio Eagle modificado por Dulbecco (en lo sucesivo denominado "DMEM"). En este caso, de 3 a 4 días antes de realizar la fusión celular, las células se subcultivan en un medio normal (por ejemplo, un medio ASF104 (fabricado por Ajinomoto Co., Ltd.) que contiene FCS al 10 % para asegurar no menos de  $2 \times 10^7$  células en el día de la fusión celular.

(d) Fusión celular

55 Se puede llevar a cabo de manera adecuada la fusión entre las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma de acuerdo con un método conocido (Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), etc.), en condiciones tales que la tasa de supervivencia de



las células no se reduzca excesivamente.

5 Como dicho procedimiento, por ejemplo, puede usarse un procedimiento químico en el que las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma se mezclan en una solución que contiene un polímero tal como polietilenglicol a alta concentración, un procedimiento físico que usan estimulación eléctrica, o similar. Entre estos métodos, un ejemplo específico del procedimiento químico es tal como se describe a continuación.

Es decir, en el caso donde se utiliza polietilenglicol en la solución que contiene un polímero a una alta concentración, las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma se mezclan en una solución de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 1500 a 6000, más preferentemente 2000 a 4000 a una temperatura de entre 30 a 40 °C, preferentemente de 35 a 38 °C durante 1 a 10 minutos, preferentemente 5 a 8 minutos.

10 (e) Selección de un grupo de hibridomas

El método de seleccionar hibridomas obtenidos mediante la fusión celular anteriormente descrita no está particularmente limitado. Normalmente, se usa un método de selección de HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) (Kohler y col., Nature (1975), 256, pág. 495; Millstein y col., Nature (1977), 266, pág. 550).

15 Este método es eficaz cuando se obtienen hibridomas utilizando las células de mieloma de una cepa deficiente en HGPRT que no puede sobrevivir en presencia de aminopterina. Es decir, cultivando células e hibridomas sin fusionar en un medio HAT, solo los hibridomas resistentes a aminopterina se dejan sobrevivir y proliferar selectivamente.

(f) División en clones de células individuales (clonación)

20 Como métodos de clonación para los hibridomas, se pueden usar un método conocido tal como un método de la metilcelulosa, un método de agarosa blanda, o un método de dilución limitante (véase, por ejemplo, Barbara, B. M. y Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Entre estos métodos, particularmente, se prefiere un método de cultivo tridimensional tal como un método de metilcelulosa. Por ejemplo, el grupo de hibridomas producidos mediante fusión celular se suspenden en un medio de metilcelulosa tal como el Medio D de Selección ClonaCell-HY (fabricado por StemCell Technologies, Inc., n.º 03804) y se cultivan. Después, se recogen las colonias de hibridomas formados, por lo cual se pueden obtener hibridomas monoclonales. Las colonias de hibridomas respectivas recogidas se cultivan, y se selecciona un hibridoma que se ha confirmado que tiene un título de anticuerpos estable en un sobrenadante de cultivo de hibridomas obtenido como una cepa de hibridoma productora de anticuerpos monoclonales contra TROP2.

25 Los ejemplos de la cepa de hibridoma establecido de esta manera incluyen el hibridoma TINA1 de TROP2. En la presente memoria descriptiva, Un anticuerpo producido por el hibridoma TINA 1 de TROP2 se denomina "anticuerpo TINA1" o simplemente "TINA1".

La región variable de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 tiene una secuencia de aminoácido representada por la SEQ ID NO: 2 en el Listado de Secuencias. Además, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4 en el Listado de Secuencias.

(g) Preparación de anticuerpo monoclonal mediante cultivo de hibridoma

35 Cultivando el hibridoma seleccionado de esta manera, se puede obtener eficazmente un anticuerpo monoclonal. Sin embargo, antes del cultivo, se prefiere llevar a cabo el cultivo de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal diana.

En dicho cribado, se puede emplear un método conocido.

40 La medición del título de anticuerpos en la invención se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, un método ELISA explicado en el artículo (b) descrito anteriormente.

El hibridoma obtenido mediante el método descrito anteriormente se puede almacenar en un estado congelado en nitrógeno líquido o en un congelador a -80 °C o por debajo.

Tras la finalización de la clonación, se cambia el medio de un medio HT a un medio normal, y se cultiva el hibridoma.

45 se lleva a cabo un cultivo a gran escala mediante cultivo en rotación utilizando un matraz de cultivo grande o mediante un cultivo con agitador. A partir del sobrenadante obtenido mediante el cultivo a gran escala, se puede obtener un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína de la invención mediante purificación utilizando un método conocido por el experto en la materia tal como filtración en gel.

50 Además, el hibridoma se inyecta en la cavidad abdominal de un ratón de la misma variedad que el del hibridoma (por ejemplo, el ratón BALB/c anteriormente descrito) o un ratón Nu/Nu para hacer proliferar el hibridoma, por lo cual se puede obtener el fluido ascítico que contiene una gran cantidad del anticuerpo monoclonal de la invención.

En el caso cuando se administra el hibridoma en la cavidad abdominal, si se administra un aceite mineral tal como

2,6,10,14-tetrametil pentadecano (pristano) 3 a 7 días antes del anterior, se puede obtener una gran cantidad de fluido ascítico.

5 Por ejemplo, se inyectó previamente un inmunosupresor en la cavidad abdominal de un ratón de la misma variedad que la del hibridoma para inactivar los linfocitos T. 20 días después, se suspendieron  $10^6$  a  $10^7$  células de clones de hibridoma en un medio exento de suero (0,5 ml), y la suspensión se administró en la cavidad abdominal del ratón. En general, cuando el abdomen se expandió y se rellenoó con el fluido ascítico, el fluido ascítico se recogió a partir del ratón. Mediante este método, se puede obtener el anticuerpo monoclonal a una concentración que es aproximadamente 100 veces o mucho más que la solución en el cultivo.

10 El anticuerpo monoclonal obtenido mediante el método anteriormente descrito se puede purificar mediante un método descrito en, por ejemplo, Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

El anticuerpo monoclonal obtenido de esta manera tiene una alta especificidad antigénica por TROP2.

(h) Ensayo de anticuerpo monoclonal

El isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal obtenido de esta manera se puede determinar como sigue.

15 En primer lugar, los ejemplos del método de identificación incluyen un método Ouchterlony, un método ELISA, y un método RIA.

Un método Ouchterlony es sencillo, pero cuando la concentración del anticuerpo monoclonal es baja, se requiere una operación de condensación.

20 Por otra parte, cuando se usa un método ELISA o un método RIA, haciendo reaccionar directamente el sobrenadante del cultivo con un antígeno adsorbido en fase sólida y utilizando anticuerpos que corresponden a diversos isotipos y subclases de inmunoglobulinas como anticuerpos secundarios, se pueden identificar el isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal.

Además, como método más sencillo, se puede utilizar también un kit de identificación comercialmente disponible (por ejemplo, Mouse Typer Kit fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) o similar.

25 Además, se puede llevar a cabo la determinación cuantitativa de una proteína mediante el método de Folin Lowry y un método de cálculo basado en la absorbancia a 280 nm ( $1,4 (DO\ 280) = 1\ \text{mg/ml de Inmunoglobulina}$ ).

30 Además, incluso cuando el anticuerpo monoclonal se obtiene por separado e independientemente llevando a cabo de nuevo las etapas de (a) a (h) en (2), es posible obtener un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la del anticuerpo TINA1. Como ejemplo de dicho anticuerpo, se puede ilustrar un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo TINA1. Si un anticuerpo monoclonal producido recientemente se une a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la cual se une el anticuerpo TINA1, se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo TINA 1. Además, confirmando que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo TINA1 por la unión a TROP2 (es decir, el anticuerpo monoclonal inhibe la unión entre el anticuerpo TINA1 y TROP2), se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TROP2 incluso si no se ha determinado la secuencia específica del epítipo. Cuando se confirma que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TROP2, se espera firmemente que el anticuerpo monoclonal tenga la afinidad de unión a antígeno y una actividad biológica equivalente a la del anticuerpo TINA1.

(3) Otros anticuerpos

40 El anticuerpo de la invención incluye no solo el anticuerpo monoclonal anteriormente descrito contra TROP2 sino también un anticuerpo recombinante obtenido mediante modificación artificial a fin de disminuir la antigenicidad heteróloga en seres humanos tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Estos anticuerpos se pueden producir utilizando un método conocido.

45 Como el anticuerpo quimérico, un anticuerpo en el que el anticuerpo variable y las regiones constantes se derivan de diferentes especies, por ejemplo, se puede ilustrar un anticuerpo quimérico en que la región variable de un anticuerpo derivado de ratón o rata se une a una región constante de un anticuerpo derivado de ser humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)).

50 Como anticuerpo humanizado, un anticuerpo obtenido integrando solo una región determinante de la complementariedad (CDR) en un anticuerpo derivado de ser humano (véase Nature (1986) 321, págs. 522-525), y se puede ilustrar un anticuerpo obtenido injertando una parte de los restos de aminoácidos del marco, así como la secuencia CDR de un anticuerpo humano mediante un método de injerto a la CDR (publicación internacional n.º WO 90/07861).

Sin embargo, el anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo TINA1 no está limitado a un anticuerpo humanizado

específico siempre que el anticuerpo humanizado tenga los 6 tipo de secuencias de CDR del anticuerpo TINA 1. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 tiene una CDRH1 (TAGMQ) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 23 en el Listado de Secuencias, CDRH2 (WINTHSGVPKYAEDFKG) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 24 en el Listado de Secuencias, y CDRH3 (SGFGSSYWYFDV) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 25 en el Listado de Secuencias. Además, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo TINA1 tiene una CDRL1 (KASQDVSTAVA) que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 26 en el Listado de Secuencias, CDRL2 (SASYRYT) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 27 en el Listado de Secuencias, y CDRL3 (QQHYITPLT) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 en el Listado de Secuencias.

Como ejemplo del anticuerpo humanizado de un anticuerpo TINA1 de ratón, una combinación arbitraria de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una cualquiera de (1) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 12, 14, o 16 en el Listado de Secuencias, (2) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95 % o más con la secuencia de aminoácidos (1) descrita anteriormente, y (3) una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen o añaden uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (1) descrita anteriormente, y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera de uno cualquiera de (4) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO: 18, 20, o 22 en el Listado de Secuencias, (5) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95 % o más con la secuencia de aminoácidos (4) descrita anteriormente, y se puede ilustrar (6) una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen o añaden uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (4) descrita anteriormente.

El término "varios" como se usa en el presente documento se refiere a 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, o 1 o 2.

Como la sustitución de aminoácidos en esta memoria descriptiva, se prefiere una sustitución de aminoácidos conservativa. La sustitución de aminoácidos conservativa se refiere a una sustitución que se produce en un grupo de aminoácidos relacionados con las cadenas secundarias de aminoácidos. Los grupos de aminoácidos preferidos son de la siguiente forma: un grupo ácido (ácido aspártico y ácido glutámico); un grupo básico (lisina, arginina e histidina); un grupo no polar (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, y triptófano); y una familia polar sin cargar (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, y tirosina). Los grupos aminoácidos más preferidos son de la siguiente forma: un grupo hidroxil alifático (serina y treonina); un grupo que contiene amida (asparagina y glutamina); un grupo alifático (alanina, valina, leucina e isoleucina); y un grupo aromático (fenilalanina, triptófano, y tirosina). Dicha sustitución de aminoácidos se lleva a cabo preferentemente con un intervalo que no deteriora las propiedades de una sustancia que tiene la secuencia de aminoácidos original.

Como un anticuerpo que tiene una combinación preferida de una cadena pesada y una cadena ligera descritas anteriormente, un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende una región variable que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO:18; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende una región variable que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO:22; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende una región variable que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO:18; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende una región variable que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO:20; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende una región variable que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO:22; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que comprende una región variable que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO:18; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que comprende una región variable que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO:20; y un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que comprende una región



descritas anteriormente, un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 470 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO:18; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 470 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO:18; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 470 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO:20; y se puede ilustrar un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 470 de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO:22.

Además, como un anticuerpo que tiene una combinación superior más preferida de una cadena pesada y una cadena ligera descritas anteriormente, un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 469 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO:18; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 469 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO:18; un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 469 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO:20; y se puede ilustrar un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 20 a 469 de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en las posiciones de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO:22.

Combinando una secuencia que tiene una alta homología con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada anteriormente descrita con una secuencia que tiene una alta homología con la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera anteriormente descrita, es posible seleccionar un anticuerpo que tenga una actividad biológica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente. Dicha homología es generalmente una homología de 80 % o más, preferentemente una homología de 90 % o más, más preferentemente una homología de 95 % o más, de preferencia una homología de 99 % o más. Además, combinando una secuencia de aminoácidos en la que se sustituyen, eliminan o añaden uno a varios restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada o la cadena ligera, es también posible seleccionar un anticuerpo que tenga una actividad biológica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos anteriormente descritos.

Se puede determinar la homología entre dos secuencias de aminoácidos utilizando parámetros por defecto del algoritmo Blast versión 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST y PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). El algoritmo Blast se puede usar también a través de Internet accediendo al sitio [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesad representada por la SEQ ID NO: 12, 14 o 16 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 19 es una secuencia de señalización, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 140 es una región variable, y una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 141 a 470 es una región constante. Las secuencias de SEQ ID NO: 12, 14 y 16 se muestran en la Fig. 3, 4 y 5 respectivamente.

Además, en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO: 18, 20 o 22 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 20 es una secuencia de señalización, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 129 es una región variable, y una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 130 a 234 es una región constante. Las secuencias de SEQ ID NO: 18, 20 y 22 se muestran en la Fig. 6, 7 y 8 respectivamente.

Además, el anticuerpo de la invención incluye un anticuerpo humano que se une a TROP2. Un anticuerpo humano anti-TROP2 se refiere a un anticuerpo humano que tiene solo una secuencia de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano. El anticuerpo humano anti-TROP2 se puede obtener mediante un método que utiliza un ratón productor de anticuerpos humanos que tiene un fragmento de cromosoma humano que comprende genes de la cadena pesad y la cadena ligera de un anticuerpo humano (veáanse Tomizuka, K. y col., *Nature Genetics* (1997) 16, páginas. 133-143; Kuroiwa, Y. y col., *Nucl. Acids Res.* (1998) 26, páginas. 3447-3448; Yoshida, H. y col., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* vol. 10, págs. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. e Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, págs. 722-727, etc.).

Dicho ratón productor de anticuerpos humanos puede crearse específicamente de la siguiente forma. Un animal modificado genéticamente en el que se han interrumpido los loci endógenos génicos de la cadena pesad y la cadena ligera de la inmunoglobulina, y a su vez, los loci génicos de la cadena pesada y la cadena ligera de la

inmunoglobulina humana se han introducido mediante un vector de un cromosoma artificial de levadura (YAC) o similar que se crea produciendo un animal inactivado genéticamente y un animal transgénico y apareando estos animales.

5 Además, de acuerdo con una técnica de ADN recombinante, utilizando los ADNc que codifican cada una de dichas una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo humano, y preferentemente un vector que comprende dichos ADNc, las células eucariotas se transforman y se cultiva una célula transformante que produce un anticuerpo monoclonal humano recombinante, por lo cual, el anticuerpo se puede obtener también a partir del sobrenadante del cultivo.

10 Aquí, como hospedador, se pueden usar, por ejemplo, células eucariotas, preferentemente células de mamífero tales como células CHO, linfocitos, o células de mieloma.

15 Además, se conoce también un método para obtener un anticuerpo humano derivado mediante expresión en fago seleccionado entre una biblioteca de anticuerpos humanos (véanse Wormstone, I. M. y col., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. (2002) 43 (7), págs. 2301-2308; Carmen, S. y col., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), págs. 189-203; Siriwardena, D. y col., *Ophthalmology* (2002) 109 (3), pp. 427-431, etc.).

Por ejemplo, se selecciona un método de expresión en fago en el que una región variable de un anticuerpo humano se expresa sobre la superficie del fago como un anticuerpo monocatenario (scFv), y se puede usar un fago que se une a un antígeno (*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9), págs. 1105-1116).

20 Analizando el gen del fago seleccionado basándose en la unión a un antígeno, se puede determinar una secuencia de ADN que codifica la región variable de un anticuerpo humano que se une a un antígeno.

25 Si se determina la secuencia de ADN de scFv que se une a un antígeno, se puede obtener un anticuerpo humano preparando un vector de expresión que comprende la secuencia e introduciendo el vector en un hospedador adecuado para expresar este (Publicación internacional n.º WO 92/01047, Los documentos WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388; *Annu. Rev. Immunol.* (1994) 12, págs. 433-455; *Nature Biotechnology* (2005) 23 (9), págs. 1105-1116).

30 Si un anticuerpo humano producido recientemente se une a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la cual se une el anticuerpo TINA1, se puede determinar que el anticuerpo humano se une al mismo epítipo que el anticuerpo TINA 1. Además, confirmando que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo TINA1 por la unión a TROP2 (es decir, el anticuerpo monoclonal inhibe la unión entre el anticuerpo TINA1 y TROP2), se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo TINA 1 incluso si no se ha determinado la secuencia o estructura específica del epítipo. Cuando se confirma que el anticuerpo humano se une al mismo epítipo que el anticuerpo TINA1, se espera firmemente que el anticuerpo humano tenga una actividad biológica equivalente a la del anticuerpo TINA1.

35 Los anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, o anticuerpos humanos obtenidos mediante el método anteriormente descrito se evalúan para la propiedad de unión a un antígeno mediante un método conocido o similar, y se puede seleccionar un anticuerpo preferido.

40 Como ejemplo de otro índice para su uso en la comparación de las propiedades de los anticuerpos, se puede ilustrar la estabilidad de los anticuerpos. La calorimetría de barrido diferencial (DSC) es un dispositivo capaz de medir rápidamente y con precisión una temperatura intermedia de desnaturalización térmica (Tm) que se va a usar como un índice favorable de estabilidad conformacional relativa de las proteínas. Midiendo los valores de la Tm utilizando DSC y comparando los valores, se puede comparar una diferencia en la estabilidad térmica. Se sabe que la estabilidad en almacenamiento de los anticuerpos muestra alguna correlación con la estabilidad térmica de los anticuerpos (Lori Burton, y col., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, págs. 265-273), y se puede seleccionar un anticuerpo preferido utilizando la estabilidad térmica como un índice. Los ejemplos de otros índices para seleccionar anticuerpos incluyen las siguientes características: el rendimiento en una célula hospedadora adecuada es alto; y la agregabilidad en una solución acuosa es baja. Por ejemplo, un anticuerpo que muestra el rendimiento más alto no siempre muestra la estabilidad térmica más elevada, y por tanto, es necesario seleccionar un anticuerpo más adecuado para la administración a seres humanos realizando una evaluación comprehensiva basándose en los índices anteriormente descritos.

50 En la presente invención, se incluye también una variante modificada del anticuerpo. La variante modificada se refiere a una variante obtenida sometiendo el anticuerpo de la presente invención a modificación química o biológica. Los ejemplos de la variante modificada químicamente incluyen variantes modificadas químicamente uniendo un resto químico a un esqueleto de aminoácido, las variantes modificadas químicamente con una cadena de hidrato de carbono unida a N o unida a O, etc. Los ejemplos de variantes modificadas biológicamente incluyen variantes obtenidas mediante modificación posterior a la traducción (tales como glicosilación unida a N o glicosilación unida a O, procesamiento del extremo N o el extremo C, desamidación, isomerización de ácido aspártico, u oxidación de metionina), y variantes en las que se ha añadido un resto de metionina a extremo N que se expresa en una célula hospedadora procarriota.

Además, se incluyen también en el significado de la variante modificada un anticuerpo marcado de tal manera que permita la detección o el aislamiento del anticuerpo o un antígeno de la invención, por ejemplo, un anticuerpo marcado con enzima, un anticuerpo marcado con fluorescencia, y un anticuerpo marcado con afinidad. Dicha variante modificada del anticuerpo de la invención es útil para mejorar la estabilidad y la retención en sangre del anticuerpo, reduciendo su antigenicidad, detectando o aislando un anticuerpo o un antígeno, y así sucesivamente.

Además, regulando la modificación de un glicano que se une al anticuerpo de la invención (glicosilación, defucosilación, etc.), es posible potenciar una actividad citotóxica celular dependiente del anticuerpo. Como técnica para regular la modificación de un glicano de los anticuerpos, se conocen la publicación internacional n.º WO 1999/54342, WO 2000/61739, WO 2002/31140, etc. Sin embargo, la técnica no se limita a lo anterior. En el anticuerpo de la presente invención, está también incluido un anticuerpo en el que está regulada la modificación de un glicano.

En el caso donde se produce un anticuerpo aislando en primer lugar un gen de anticuerpo e introduciendo a continuación en gen en un hospedador adecuado, se puede usar una combinación de un hospedador adecuado y un vector de expresión adecuado. Los ejemplos específicos del gen de anticuerpo incluyen una combinación de un gen que codifica una secuencia de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en esta memoria descriptiva y un gen que codifica una secuencia de la cadena ligera del mismo. Cuando se transforma una célula hospedadora, es posible insertar el gen de la secuencia de la cadena pesada y el gen de la secuencia de la cadena ligera en el mismo vector de expresión, y también en diferentes vectores de expresión por separado.

En el caso donde las células eucariotas se usan como hospedador, se pueden usar células animales, células vegetales y microorganismos eucariotas. Como células de animales, se pueden ilustrar células de mamífero, por ejemplo, células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, págs. 175-182, ATCC CRL-1650 del VIH), fibroblastos NIH3T3 de murino (ATCC n.º CRL-1658), y cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, págs. 4126-4220) de células de ovario de hámster chino (células CHO; ATCC: CCL-61).

En el caso donde se usan células procariotas, se pueden ilustrar, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

Introduciendo un gen de anticuerpo deseado en estas células mediante transformación, y cultivando las células transformadas de esta manera *in vitro*, se puede obtener el anticuerpo. En el método de cultivo anteriormente descrito, el rendimiento puede variar algunas veces dependiendo de la secuencia del anticuerpo, y por tanto, es posible seleccionar un anticuerpo que se produce fácilmente como un compuesto farmacéutico utilizando el rendimiento como un índice entre los anticuerpos que tienen una actividad de unión equivalente. Por lo tanto, en el anticuerpo de la presente invención, se incluye también un anticuerpo obtenido mediante un procedimiento para producir un anticuerpo, caracterizado por incluir una etapa de cultivar la célula hospedadora transformada y una etapa de recoger un anticuerpo deseado a partir de un producto cultivado obtenido en la etapa de cultivo.

Se sabe que se elimina un resto de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en la célula de mamífero cultivada (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), y se sabe también que se eliminan dos restos de aminoácidos (glicina y lisina) en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada y se amida un resto de prolina localizado recientemente en el extremo carboxilo (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, dicha deleción y modificación de la secuencia de la cadena pesada no afecta la afinidad de unión al antígeno y la función efectora (la activación de un complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, etc.) del anticuerpo. Por lo tanto, en el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, se incluyen también un anticuerpo sometido a dicha modificación y un fragmento funcional del anticuerpo, y una variante de deleción en la que uno o dos aminoácidos se han eliminado en el extremo carboxilo de la cadena pesada, están abarcadas también una variante obtenida mediante amidación de la variante de deleción (por ejemplo, una cadena pesada en la que se ha amidado el resto de prolina en el extremo carboxilo), y similares. El tipo de variante de deleción que tiene una deleción en el extremo carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la invención no está limitado a las variantes anteriores siempre que la afinidad de unión a antígeno y la función efectora se conserven. Las dos cadenas pesadas que constituyen el anticuerpo de acuerdo con la invención pueden ser de un tipo seleccionado entre el grupo que consiste en una cadena pesada de longitud completa y la variante de deleción anteriormente descrita, o puede ser de dos tipos combinados seleccionados de los anteriores. La relación de la cantidad de cada variante de deleción puede ser alterada por el tipo de células de mamífero cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo con la invención y las condiciones de cultivo, sin embargo, puede ilustrarse un caso donde se ha eliminado un resto de aminoácido en el extremo carboxilo en ambas dos cadenas pesadas contenidas como componentes principales en el anticuerpo de acuerdo con la invención.

Puede ilustrarse un isotipo del anticuerpo de la invención, por ejemplo, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), y se pueden ilustrar preferentemente IgG1 o IgG2.

Como actividad biológica del anticuerpo, generalmente se puede ilustrar una actividad de unión a antígeno, una actividad de internalización en células que expresan un antígeno mediante la unión al antígeno, una actividad de neutralización de la actividad de un antígeno, una actividad de potenciación de la actividad de un antígeno, una

actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y una actividad de fagocitosis mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCP). La función del anticuerpo de la presente invención es una actividad de unión a TROP2, preferentemente una actividad de internalización en células que expresan TROP2 mediante la unión a TROP2. Además, el anticuerpo de la presente invención puede tener una actividad ADCC, una actividad CDC, y/o una actividad ADCP además de una actividad de internalización celular.

El anticuerpo obtenido puede purificarse hasta homogeneidad. La separación y la purificación del anticuerpo puede llevarse a cabo empleando un método de separación y purificación de proteínas adicional. Por ejemplo, el anticuerpo se puede separar y purificar seleccionando y combinando adecuadamente la cromatografía en columna, filtración mediante filtro, ultrafiltración, precipitación con sal, diálisis, electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, electroforesis mediante electrofocalización isoelectrica, y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak y col. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero el método no se limita a lo anterior.

Los ejemplos de dicha cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en fase inversa y cromatografía de adsorción.

Dicha cromatografía puede llevarse a cabo empleando cromatografía líquida tal como HPLC o FPLC.

Como una columna que se va a usar en la cromatografía de afinidad, se puede ilustrar una columna de Proteína A y una columna de Proteína G. Por ejemplo, como una columna que utiliza una columna de Proteína A, se puede ilustrar Hyper D, POROS, Sefarosa FF (Pharmacia) y similares.

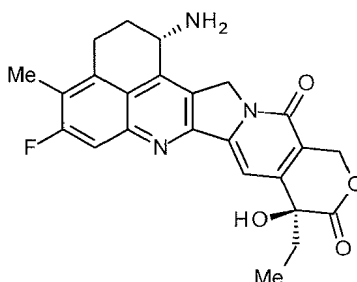
Además, utilizando un transportador que tiene un antígeno inmovilizado en el anterior, el anticuerpo se puede purificar también utilizando la propiedad de unión del anticuerpo al antígeno.

[Compuesto antitumoral]

Se explica el compuesto antitumoral que se va a conjugar con el conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención. El compuesto antitumoral utilizado en la presente invención no está particularmente limitado si es un compuesto que tiene un efecto antitumoral y un grupo sustituyente o una estructura parcial que permite la conexión a una estructura del enlazador. Cuando una parte o el enlazador completo se escinde en células tumorales, el resto de compuesto antitumoral se libera para presentar el efecto antitumoral del compuesto antitumoral. A medida que el enlazador se escinde en una posición de unión al fármaco, el compuesto antitumoral se libera en su estructura modificada para presentar su efecto antitumoral intrínseco.

Como el compuesto antitumoral usado en la presente invención, exatecán (((1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-10,13(9H,15H)-diona; que se muestra en la siguiente fórmula), se puede usar preferentemente uno de los derivados de camptotecina.

[Fórmula 14]



Aunque teniendo un excelente efecto antitumoral, exatecán no se ha comercializado como un fármaco antitumoral. El compuesto puede obtenerse fácilmente mediante un método conocido y el grupo amino en la posición 1 puede utilizarse preferentemente como una posición de unión a la estructura del enlazador. Además, aunque exatecán puede también liberarse en células tumorales aunque parte del enlazador está unido todavía al anterior, es un excelente compuesto que presenta un excelente efecto antitumoral incluso en dicha estructura.

Debido a que exatecán tiene la estructura de camptotecina, se sabe que el equilibrio se desplaza a una estructura con un anillo de lactona cerrado (anillo cerrado) en un medio ácido acuoso (por ejemplo, pH 3 más o menos) pero se desplaza a una estructura con un anillo de lactona abierto (anillo abierto) en un medio básico acuoso (por ejemplo, pH 10 más o menos). Un conjugado de fármaco que se introduce con un resto de exatecán que corresponde a la estructura de anillo cerrado y la estructura de anillo abierto se espera también que tenga el mismo efecto antitumoral



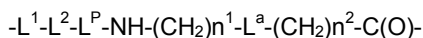
y es necesario decir que cualquiera de estos estados está comprendido en el ámbito de la presente invención.

Otros ejemplos del compuesto antitumoral pueden incluir doxorubicina, daunorrubicina, mitomicina C, bleomicina, ciclocitidina, vincristina, vinblastina, metotrexato, agente antitumoral basado en platino (cisplatino o sus derivados), taxol o sus derivados, y camptotecina o sus derivados (agente antitumoral descrito en la patente japonesa abierta a consulta n.º 6-87746).

Con respecto al conjugado de fármaco anticuerpo, el número de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo es un factor clave que tiene una influencia sobre la eficacia y la seguridad. La producción del conjugado de anticuerpo-fármaco se lleva a cabo definiendo la condición de reacción que incluye las cantidades de uso de las materias primas y reactivos para la reacción con el fin de tener un número constante de moléculas de fármaco conjugadas, y el conjugado de fármaco-anticuerpo se obtiene generalmente como una mezcla que contiene diferentes cantidades de moléculas de fármaco conjugadas, a diferencia de la reacción química de un compuesto de bajo peso molecular. La cantidad de fármacos conjugados en una molécula de anticuerpo se expresa o especifica mediante el valor promedio, es decir, el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas. Salvo que se describa específicamente lo contrario como un principio, el número de moléculas de fármaco conjugadas significa un valor promedio excepto en un caso en el que representa un conjugado de fármaco-anticuerpo que tiene un número específico de moléculas de fármaco conjugadas que está incluido en una mezcla de un conjugado de fármaco-anticuerpo que tiene diferente número de moléculas de fármaco conjugadas. El número de moléculas de fármaco conjugadas a una molécula de anticuerpo es controlable, y como número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por anticuerpo, se pueden unir aproximadamente 1 a 10 exatecanos. Preferentemente, es 2 a 8 y más preferentemente 3 a 8. Mientras tanto, una persona experta en la materia puede diseñar una reacción para conjugar un número requerido de moléculas de fármaco con una molécula de anticuerpo basándose en la descripción de los Ejemplos de la presente solicitud y puede obtener un conjugado de fármaco-anticuerpo con un número controlado de moléculas de exatecán.

[Estructura del enlazador]

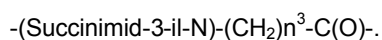
Con respecto al conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención, se explica la estructura del enlazador para conjugar un compuesto antitumoral con el anticuerpo anti-TROP2. El enlazador tiene una estructura de la siguiente fórmula:



El anticuerpo se une al extremo de  $L^1$  ( extremo opuesto a la unión con  $L^2$ ), y el compuesto antitumoral se une al grupo carbonilo del resto  $-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ .  $n^1$  representa un entero de 0 a 6 y es preferentemente un entero de 1 a 5, y más preferentemente 1 a 3.

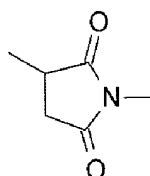
1.  $L^1$

$L^1$  se representa mediante la estructura de



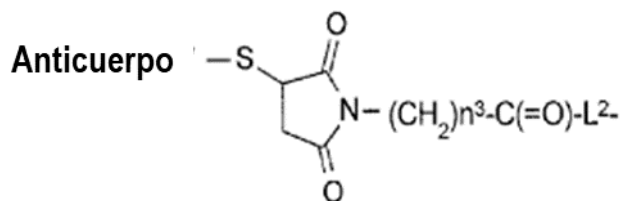
En lo anterior,  $n^3$  es un entero de 2 a 8, y " $-(\text{Succinimid-3-il-N})-$ " tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 15]



La posición 3 de la estructura parcial anterior es una posición de unión al anticuerpo anti-TROP2. El enlace con el anticuerpo anti-TROP2 en la posición 3 se caracteriza por la unión con la formación tioéter. El átomo de nitrógeno en la posición 1 del resto de la estructura se une al átomo de carbono del metileno que está presente en el enlazador incluyendo la estructura. Específicamente,  $-(\text{Succinimid-3-il-N})-(CH_2)n^3-C(=O)-L^2-$  es una estructura representada por la siguiente fórmula (en el presente documento, "anticuerpo-S-" se origina a partir de un anticuerpo).

[Fórmula 16]



En la fórmula,  $n^3$  es un entero de 2 a 8, y preferentemente 2 a 5.

Los ejemplos específicos de  $L^1$  pueden incluir

- 5
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

2.  $L^2$

$L^2$  es un enlazador representado por la siguiente estructura:

- 10 -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O) $n^4$ -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,

$L^2$  puede no estar presente, y en tal caso,  $L^2$  es un enlace simple. En lo anterior,  $n^4$  es un entero de 1 a 6, y preferentemente 2 a 4.  $L^2$  está unido a  $L^1$  en su grupo del extremo amino y está unido a  $L^P$  en su grupo carbonilo en el otro extremo.

Los ejemplos específicos de  $L^2$  pueden incluir

- 15
- NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- 20 -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

3.  $L^P$

$L^P$  es un resto tetrapéptido de -GGFG- (en el que G = glicina (Gly); F = fenilalanina (Phe)).

4.  $L^a$ -(CH<sub>2</sub>) $n^2$ -C(=O)-

- 25  $L^a$  in  $L^a$ -(CH<sub>2</sub>) $n^2$ -C(=O)- es una estructura de -O- o un enlace simple.  $n^2$  es un entero de 0 a 5, más preferentemente de 0 a 3, más preferentemente 0 o 1.

Los ejemplos de  $L^a$ -(CH<sub>2</sub>) $n^2$ -C(=O)- pueden incluir aquellos que tienen las siguientes estructuras:

- 30
- O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- 35
- CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

De estas,

- O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, o

- 40 se prefiere un caso en el que  $L^a$  es un enlace simple, y  $n^2$  es 0.

Los ejemplos específicos de la estructura representada por -NH-(CH<sub>2</sub>) $n^1$ - $L^a$ -(CH<sub>2</sub>) $n^2$ -C(=O)- en el enlazador pueden incluir

- NH-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-,
  - 5 -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
  - NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.
- 10 -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-, o -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-  
 es más preferido.

En el enlazador, La longitud de la cadena de -NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n</sup>-C(=O)- es preferentemente una longitud de cadena de 4 a 7 átomos, y más preferentemente una longitud de cadena de 5 o 6 átomos.

- 15 Con respecto al conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención, se considera que cuando el conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 se transfiere al interior de las células tumorales, el resto enlazador se escinde y el derivado de fármaco que tiene una estructura representada por NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n</sup>-C(=O)-(NH-DX) se libera para expresar una acción antitumoral. Los ejemplos del derivado antitumoral que presenta un efecto antitumoral mediante la liberación del conjugado de fármaco-anticuerpo de la presente invención incluye un derivado antitumoral que tiene un resto de estructura en el que la estructura representada por -NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n</sup>-C(=O)- del enlazador tiene un grupo en el extremo amino, y el particularmente preferido incluye los siguientes.
- 20 NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

- 25 Mientras tanto, en el caso de NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), se confirmó que, como la estructura aminal en la molécula es inestable, esta experimenta de nuevo una autodegradación para liberar el HO-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX) siguiente. Aquellos compuestos se pueden usar también preferentemente como intermedio de producción del conjugado de fármaco-anticuerpo de la presente invención.

- 30 Para el conjugado de fármaco anticuerpo de la presente invención en el que exatecan se usa como un fármaco, es preferible que el resto de estructura fármaco-enlazador [-L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>P</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n</sup>-C(=O)-(NH-DX)] que tiene la siguiente estructura se una a un anticuerpo. La cantidad conjugada promedio de restos de dicha estructura de fármaco-enlazador por anticuerpo puede ser de 1 a 10. Preferentemente, es 2 a 8 y más preferentemente 3 a 8.

- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- 35 - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- 40 - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- 45 - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Entre ellos, los más preferidos son los siguientes.

- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- 50 - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- 55 - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Los particularmente preferidos son los siguientes.

- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(O)-(NH-DX).

5 Con respecto a la estructura del enlazador para conjugar el anticuerpo anti-TROP2 y un fármaco en el conjugado de fármaco-anticuerpo de la presente invención, se puede construir el enlazador preferido uniendo las estructuras preferidas que se muestran para cada parte del enlazador explicada anteriormente. Como para la estructura del enlazador, se pueden usar preferentemente aquellos con la siguiente estructura. Mientras tanto, el extremo izquierdo de la estructura es una posición de unión con el anticuerpo y el extremo derecho es una posición de unión con el fármaco.

- 10 - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- 15 - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(O)-,
- 20 - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

Entre ellos, los más preferidos son los siguientes.

- 25 - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- 30 - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

Los particularmente preferidos incluyen los siguientes.

- 35 - (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(O)-.

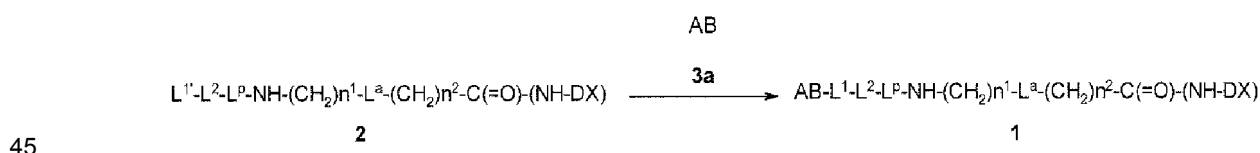
### 35 [Método de producción]

A continuación, se proporcionan explicaciones del método representativo para producir el conjugado de fármaco-anticuerpo de la presente invención o una producción intermedia del mismo. Mientras tanto, Los compuestos se describen en lo sucesivo en el presente documento con el número de compuesto que se muestra en cada fórmula de reacción. Específicamente, se denominan "compuesto de Fórmula (1)", un "compuesto (1)", o similares. Los compuestos con números diferentes de aquellos que se describen de forma similar.

#### 1. Método de producción 1

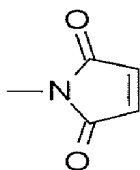
El conjugado de fármaco anticuerpo representado por la fórmula (1) que se une a la estructura de enlazador-fármaco mediante un tioéter se puede producir mediante el siguiente método, por ejemplo.

[Fórmula 17]



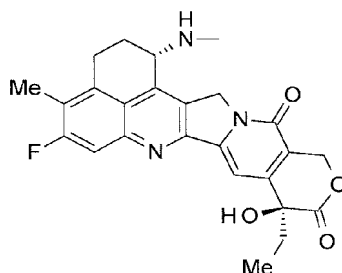
45 [En la fórmula, AB representa un anticuerpo que tiene un grupo sulfhidrido, y L<sup>1</sup> representa la estructura del enlazador L<sup>1</sup> en la que el extremo del enlazador es un grupo maleimidilo (fórmula que se muestra a continuación)

[Fórmula 18]



(en la fórmula, el átomo de nitrógeno es la posición de unión),  
y representa específicamente un grupo en el que el resto -(Succinimid-3-il-N)- en -(Succinimid-3-il-N)-(CH<sub>2</sub>)<sup>n</sup>-C(=O)-  
de L<sup>1</sup> es un grupo maleimidilo. Además, el -(NH-DX) representa una estructura representada por la siguiente  
5 fórmula:

[Fórmula 19]



y representa un grupo que se deriva eliminando un átomo de hidrógeno del grupo amino en la posición 1 de  
exatecán.]

- 10 Además, el compuesto de fórmula (1) en la anterior fórmula de reacción se interpreta como una estructura en la que un resto de estructura que corresponde al fármaco del extremo del enlazador se une a un anticuerpo. Sin embargo, solo se proporciona la descripción dada por razones de conveniencia, y existen realmente muchos casos en los que una pluralidad de restos de estructura está unidos a una molécula de anticuerpo. Lo mismo se aplica a la explicación del método de producción descrito a continuación.
- 15 Se puede producir el conjugado de fármaco-anticuerpo (1) haciendo reaccionar el compuesto (2), que es obtenible mediante el método descrito a continuación, con el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo.

- Se puede obtener el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo mediante un método bien conocido en la técnica (Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, págs. 56-136, págs. 456-493, Academic Press (1996)). Los ejemplos incluyen: se hace reaccionar el reactivo de Traut con el grupo amino del anticuerpo; se hacen reaccionar los N-succinimidil S-acetiltoalcanoatos con el grupo amino del anticuerpo seguido por reacción con hidroxilamina; tras reaccionar con 3-(piridilditio)propionato, el anticuerpo se hace reaccionar con un agente reductor; el anticuerpo se hace reaccionar con un agente reductor tal como ditiotretitol, 2-mercaptoetanol, y clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) para reducir el enlace disulfuro en una parte bisagra en el anticuerpo para formar un grupo sulfhidrilo, pero no se limita a los mismos.
- 25 Específicamente, utilizando 0,3 a 3 equivalentes molares de TCEP como un agente reductor por disulfuro en la parte bisagra en el anticuerpo y hacerlo reaccionar con el anticuerpo en una solución tampón que contiene un agente quelante, se puede obtener el anticuerpo con el disulfuro parcial o completamente reducido en la parte bisagra del anticuerpo. Los ejemplos del agente quelante incluyen ácido etilendiamina tetraacético (EDTA) y ácido dietilentiamina pentaacético (DTPA). Este se puede usar a una concentración de 1 mM a 20 mM. Los ejemplos de solución tampón que se pueden usar incluyen una solución de fosfato de sodio, borato de sodio, o acetato de sodio.
- 30 Específicamente, haciendo reaccionar el anticuerpo con TCEP de 4 °C a 37 °C durante 1 a 4 horas, se puede obtener el anticuerpo (3a) que tiene parcial o completamente reducido el grupo sulfhidrilo.

Mientras tanto, llevando a cabo la reacción añadiendo un grupo sulfhidrilo a un resto de enlazador-fármaco, el resto de enlazador-fármaco se puede conjugar mediante un enlace tioéter.

- 35 Usando 2 a 20 equivalentes molares del compuesto (2) por anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo, se puede producir el conjugado de fármaco-anticuerpo (1) en el que se conjugan 2 a 8 moléculas de fármaco por anticuerpo. Específicamente, es suficiente que la solución que contiene el compuesto (2) disuelto en la anterior se añada a una solución tampón que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo para la reacción. En el presente documento, los ejemplos de la solución tampón que se pueden usar incluyen solución de acetato de sodio, fosfato de sodio, y borato de sodio. El pH de la reacción es de 5 a 9, y más preferentemente, la reacción se lleva a cabo próxima a pH 7. Los ejemplos del disolvente para disolver el compuesto (2) incluyen un disolvente orgánico tal como dimetil sulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetil acetamida (DMA), y N-metil-2-piridona (NMP).
- 40

Es suficiente que la solución de disolvente orgánico que contiene el compuesto (2) disuelto en la anterior se añada a 1 a 20 % v/v a una solución tampón que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo para la reacción. La temperatura de reacción es de 0 a 37 °C, más preferentemente 10 a 25 °C, y el tiempo de reacción es de 0,5 a 2 horas. La reacción se puede terminar desactivando la reactividad del compuesto (2) sin reaccionar con un reactivo que contiene tiol. Los ejemplos del reactivo que contiene tiol incluyen cisteína y N-acetil-L-cisteína (NAC). Más específicamente, 1 a 2 equivalentes molares de NAC se añadieron al compuesto (2) utilizado e, incubando a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos, la reacción puede finalizar.

El conjugado de fármaco-anticuerpo producido (1) se puede someter a, tras concentración, intercambio de tampón, purificación, y medición de la concentración de anticuerpo y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo de acuerdo con los procedimientos comunes descritos a continuación, identificación del conjugado de fármaco-anticuerpo (1).

Procedimiento general A: Concentración de solución acuosa de anticuerpo o conjugado de fármaco-anticuerpo

A un recipiente Amicon Ultra (50.000 MWCO, Millipore Corporation), se añadió una solución de anticuerpo o un conjugado de fármaco-anticuerpo y la solución del anticuerpo o el conjugado de fármaco-anticuerpo se concentró mediante centrifugación (centrífuga durante 5 a 20 minutos a 2000 G a 3800 G) utilizando una centrífuga (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.). Procedimiento general B: Medición de la concentración de anticuerpo

Utilizando un detector UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), se llevó a cabo la medición de la concentración del anticuerpo de acuerdo con el método definido por el fabricante. En ese momento, se usó un coeficiente de absorción de 280 nm diferente para cada anticuerpo ( $1,3 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a  $1,8 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Procedimiento general C-1: Intercambio de tampón para el anticuerpo

columna NAP-25 (n.º de cat. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) utilizando Sephadex G-25 se equilibró el transportador con tampón fosfato (10 mM, pH 6.0; se denomina PBS6.0/EDTA en la memoria descriptiva) conteniendo cloruro de sodio (137 mM) y ácido etilendiamina tetraacético (EDTA, 5 mM) de acuerdo con el método definido por el fabricante. Se aplicó una solución acuosa del anticuerpo en una cantidad de 2,5 ml a una única columna NAP-25, y a continuación se recogió la fracción (3,5 ml) eluida con 3,5 ml de PBS6.0/EDTA. La fracción resultante se concentró mediante el Procedimiento general A. Tras medir la concentración del anticuerpo utilizando el Procedimiento general B, se ajustó la concentración de anticuerpo a 10 mg/ml utilizando PBS6.0/EDTA.

Procedimiento general C-2: Intercambio de tampón para el anticuerpo

columna NAP-25 (n.º de cat. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) utilizando Sephadex G-25 se equilibró el transportador con tampón fosfato (50 mM, pH 6.5; se denomina PBS6.5/EDTA en la memoria descriptiva) conteniendo cloruro de sodio (50 mM) y EDTA (2 mM) de acuerdo con el método definido por el fabricante. Se aplicó una solución acuosa del anticuerpo en una cantidad de 2,5 ml a una única columna NAP-25, y a continuación se recogió la fracción (3,5 ml) eluida con 3,5 ml de PBS6.5/EDTA. La fracción resultante se concentró mediante el Procedimiento general A. Tras medir la concentración del anticuerpo utilizando el Procedimiento general B, se ajustó la concentración de anticuerpo a 20 mg/ml utilizando PBS6.5/EDTA.

Procedimiento general D: Purificación de conjugado de fármaco-anticuerpo

Se equilibró la columna NAP-25 con cualquier tampón seleccionado entre tampón fosfato comercialmente disponible (PBS7.4, n.º de cat. 10010-023, Invitrogen), tampón fosfato de sodio (10 mM, pH 6,0; se denomina PBS6.0) que contiene cloruro de sodio (137 mM), y tampón acetato que contiene sorbitol (5 %) (10 mM, pH 5,5; se denomina ABS en la memoria descriptiva). Se aplicó una solución acuosa de la reacción del conjugado de fármaco-anticuerpo en una cantidad de aproximadamente 1,5 ml a la columna NAP-25, y a continuación se eluyó en una cantidad definida por el fabricante para recoger la fracción de anticuerpo. Se aplicó de nuevo la fracción recogida a la columna NAP-25 y, repitiendo 2 a 3 veces en total el proceso de purificación mediante filtración en gel para eluir con tampón, se obtuvo el conjugado de fármaco-anticuerpo excluyendo el enlazador del fármaco no conjugado y un compuesto de bajo peso molecular clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), N-acetil-L-cisteína (NAC), y dimetil sulfóxido). Procedimiento general E: Medición de la concentración de anticuerpo en el conjugado de fármaco-anticuerpo y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo (1).

Se puede calcular la concentración de fármaco conjugada en el conjugado de fármaco-anticuerpo midiendo la absorbancia UV de una solución acuosa del conjugado de fármaco-anticuerpo a las dos longitudes de onda de 280 nm y 370 nm, seguido por llevar a cabo el cálculo que se muestra a continuación.

Debido a que la absorbancia total a cualquier longitud de onda es igual a la suma de la absorbancia de cada especie química absorbente de luz que está presente en un sistema (aditividad de la absorbancia), cuando los coeficientes de absorción molar del anticuerpo y el fármaco siguen siendo los mismos antes y después de la conjugación entre el anticuerpo y el fármaco, la concentración de anticuerpo y la concentración de fármaco en el conjugado de fármaco-anticuerpo se expresan con las siguientes ecuaciones.

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280}C_D + \epsilon_{A,280}C_A \quad \text{Ecuación (I)}$$

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370}C_D + \epsilon_{A,370}C_A \quad \text{Ecuación (II)}$$

En lo anterior,  $A_{280}$  representa la absorbancia de una solución acuosa del conjugado de fármaco-anticuerpo a 280 nm,  $A_{370}$  representa la absorbancia de una solución acuosa del conjugado de fármaco-anticuerpo a 370 nm,  $A_{A,280}$  representa la absorbancia de un anticuerpo a 280 nm,  $A_{A,370}$  representa la absorbancia de un anticuerpo a 370 nm,  $A_{D,280}$  representa la absorbancia de un precursor conjugado a 280 nm,  $A_{D,370}$  representa la absorbancia de un precursor conjugado a 370 nm,  $\epsilon_{A,280}$  representa el coeficiente de absorción molar de un anticuerpo a 280 nm,  $\epsilon_{A,370}$  representa el coeficiente de absorción molar de un anticuerpo a 370 nm,  $\epsilon_{D,280}$  representa el coeficiente de absorción molar de un precursor conjugado a 280 nm,  $\epsilon_{D,370}$  representa el coeficiente de absorción molar de un precursor conjugado a 370 nm,  $C_A$  representa la concentración de anticuerpo en un conjugado de fármaco anticuerpo, y  $C_D$  representa la concentración de fármaco en un conjugado de fármaco-anticuerpo.

Como para  $\epsilon_{A,280}$ ,  $\epsilon_{A,370}$ ,  $\epsilon_{D,280}$ , y  $\epsilon_{D,370}$  en el anterior, se utilizaron los valores anteriormente preparados (valor estimado basado en el cálculo o la medición del valor obtenido mediante medición UV del compuesto. Por ejemplo, se puede estimar  $\epsilon_{A,280}$  a partir de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo utilizando un método de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423).  $\epsilon_{A,370}$  es generalmente cero.  $\epsilon_{D,280}$  y  $\epsilon_{D,370}$  pueden obtenerse basándose en la ley de Lambert-Beer (Absorbancia = concentración molar x coeficiente de absorción x longitud de la trayectoria celular) midiendo la absorbancia de una solución en la que el precursor conjugado que se va a usar se disuelve a una determinada concentración molar. Midiendo  $A_{280}$  y de una solución acuosa del conjugado de fármaco-anticuerpo y resolviendo las ecuaciones (I) y (II) simultáneas usando los valores, se pueden obtener  $C_A$  y  $C_D$ . Además, dividiendo  $C_D$  por  $C_A$ , se puede obtener la cantidad promedio de fármaco conjugado por anticuerpo.

Procedimiento general F: Medición del número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo en un conjugado de fármaco-anticuerpo - (2).

Se puede determinar también el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo en el conjugado de fármaco-anticuerpo mediante el análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) utilizando un método descrito a continuación, además del Procedimiento general E anteriormente mencionado.

#### [F-1. Preparación de una muestra para el análisis de HPLC (reducción del conjugado de fármaco-anticuerpo)]

Una solución de conjugado de fármaco-anticuerpo (aproximadamente 1 mg/ml, 60  $\mu$ l) se mezcló con una solución acuosa de ditioneitol (DTT) (100 mM, 15  $\mu$ l). La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos para escindir el enlace disulfuro entre la cadena L y la cadena H del conjugado de fármaco-anticuerpo. La muestra resultante se usó en el análisis de HPLC.

#### [F-2. análisis de HPLC]

Se llevó a cabo el análisis de HPLC en las siguientes condiciones de medición:

Sistema HPLC: Sistema HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies, Inc.)  
 Detector: Espectrómetro de absorción UV (medición de la longitud de onda: 280 nm)  
 Columna: PLRP-S (2,1 x 50 mm, 8  $\mu$ m, 1000 angstroms; Agilent Technologies, Inc., P/N PL1912-1802)  
 Temperatura de la columna: 80 °C  
 Fase móvil A: solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,04 % (TFA)  
 Fase móvil B: solución de acetonitrilo que contiene TFA al 0,04 %  
 Programa de gradiente: 29 %-36 % (0 min-12,5 min), 36 %-42 % (12,5-15 min), 42 %-29 % (15 min-15,1 min), 29 %-29 % (15,1 min-25 min)

Volumen de inyección de la muestra: 15  $\mu$ l

#### [F-3. Análisis de datos]

[F-3-1 ] en comparación con una cadena L ( $L_0$ ) y una cadena H ( $H_0$ ) de un anticuerpo no conjugado, una cadena L conjugada a fármaco (cadena L conectada a una molécula de fármaco:  $L_1$ ) y cadenas H (cadena H unida a una molécula de fármaco:  $H_1$ , cadena H unida a dos moléculas de fármaco:  $H_2$ , cadena H unida a tres moléculas de fármaco:  $H_3$ ) presenta mayor hidrofobicidad en proporción al número de moléculas de fármaco conjugadas y tiene por tanto un tiempo de retención mayor. Estas cadenas se eluyeron por tanto en el orden de  $L_0$  y  $L_1$  o  $H_0$ ,  $H_1$ ,  $H_2$ , y  $H_3$ . se puede asignar la detección de picos a cualquiera de  $L_0$ ,  $L_1$ ,  $H_0$ ,  $H_1$ ,  $H_2$ , y  $H_3$  comparando los tiempos de retención con  $L_0$  y  $H_0$ .

[F-3-2] Debido a que el enlazador del fármaco tiene absorción UV, los valores del área de los picos se corrigieron en respuesta al número de enlazador-fármaco conjugadas de acuerdo con la siguiente expresión usando los coeficientes de absorción molar de la cadena L, la cadena H, y el enlazador del fármaco.

[Expresión 1]

Valor corregido del área del pico de la cadena L ( $L_i$ )  
= Área del pico

$$x \frac{\text{Coeficiente de extinción molar de la cadena L}}{\text{Coeficiente de extinción molar de la cadena L} + \text{El número de moléculas de fármaco conjugadas} \times \text{Coeficiente de extinción molar del enlazador del fármaco}}$$

5 [Expresión 2]

Valor corregido del área del pico de la cadena H ( $H_i$ )  
= Área del pico

$$x \frac{\text{Coeficiente de extinción molar de la cadena H} \times \text{El número de moléculas de fármaco conjugadas}}{\text{Coeficiente de extinción molar de la cadena H} + \text{El número de moléculas de fármaco conjugadas} \times \text{el coeficiente de extinción molar del enlazador del fármaco}}$$

10 Aquí, como para el coeficiente de extinción molar (280 nm) de la cadena L o la cadena H de cada anticuerpo, se puede usar un valor estimado de la secuencia de aminoácidos de la cadena L o la cadena H de cada anticuerpo mediante un método de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). En el caso de hTINA, se utilizaron un coeficiente de extinción molar de 34690 y un coeficiente de extinción molar de 95000 como valores estimados para la cadena L y la cadena H, respectivamente, de acuerdo con su secuencia de aminoácidos. Como para el coeficiente de extinción molar (280 nm) del enlazador del fármaco, se usó el coeficiente de extinción molar medido (280 nm) de un compuesto en el que el grupo maleimida se convirtió en succinimida tioéter mediante la reacción de cada enlazador de fármaco con mercaptoetanol o N-acetilcisteína.

[F-3-3] Se calculó la relación del área del pico (%) de cada cadena para el total de los valores corregidos de las áreas de los picos de acuerdo con la siguiente expresión.

[Expresión 3]

20 Relación del área del pico de la cadena L =  $\frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$

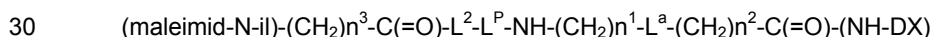
Relación del área del pico de la cadena H =  $\frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$

$A_{Li}$ ,  $A_{Hi}$ : Valores corregidos de las áreas de los picos respectivas de  $L_i$  y  $H_i$

[F-3-4] Se calculó el número promedio de las moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo en el conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con la siguiente expresión.

25 Número promedio de moléculas de fármaco conjugadas = (relación del área del pico  $L_0 \times 0$  + relación del área del pico  $L_0 \times 1$  + relación del área del pico  $H_0 \times 0$  + relación del área del pico  $H_1 \times 1$  + relación del área del pico  $H_2 \times 2$  + relación del área del pico  $H_3 \times 3$ ) / 100 x 2

El compuesto representado por la fórmula (2) en el Método de producción 1 es un compuesto representado por la siguiente fórmula:



En la fórmula,

$n^3$  representa un entero de 2 a 8,

$L^2$  representa -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sup>n<sup>4</sup></sup>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)- o un enlace sencillo,

en la que  $n^4$  representa un entero de 1 a 6,

35  $L^P$  representas un resto de tetrapéptido de -GGFG-

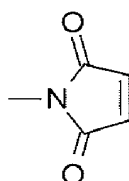
$n^1$  representa un entero de 0 a 6,

$n^2$  representa un entero de 0 a 5,

$L^a$  representa -O- o un enlace sencillo,

40 (maleimid-N-il)- es un grupo maleimidilo (grupo 2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-ilo) representado por la siguiente fórmula:

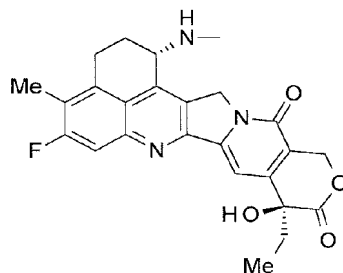
[Fórmula 20]





en la que el átomo de nitrógeno es la posición de unión, -(NH-DX) es un grupo representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 21]



en la que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es una posición de unión.

- 5 Cuando  $L^2$  es un enlace simple o  $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ , se prefiere un compuesto en el que  $n^4$  es un entero de 2 a 4 como un intermedio de producción.

Además, como para el  $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$ , un compuesto que tiene  $-NH-CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$ , o  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$  es preferido como un intermedio de producción. un compuesto que tiene  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$ , o  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2$  es más preferido.

10

Además, en el compuesto representado por la fórmula (2), un compuesto en el que  $n^3$  es un entero de 2 a 5,  $L^2$  es un enlace simple, y  $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$  es  $-NH-CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$ , o  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$  es preferido como un intermedio de producción. un compuesto en el que  $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$  es  $-NH-CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$ , o  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$  es más preferido. Se prefiere además un compuesto en el que  $n^3$  es un entero de 2 o 5.

15

Además, en el compuesto representado por la fórmula (2), un compuesto en el que  $n^3$  es un entero de 2 a 5,  $L^2$  es  $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ ,  $n^4$  es un entero de 2 a 4, y  $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$  es  $-NH-CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$ , o  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$  es preferido como un intermedio de producción. Es más preferido un compuesto en el que  $n^4$  es un entero de 2 o 4. Un compuesto en el que  $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$  es  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$ , o  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$  es además preferido.

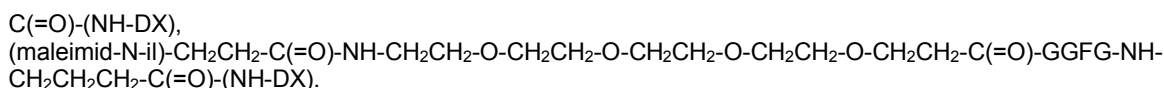
20

Como tales intermedios preferidos útiles en la producción del compuesto de la presente invención, se pueden ilustrar los siguientes.

25

- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ ,
- (maleimid-N-il)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-$

50



5 El conjugado de fármaco anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención se puede producir haciendo reaccionar un compuesto de enlazador fármaco seleccionado entre el grupo anteriormente descrito de los compuestos intermedios de producción con un anticuerpo anti-TROP2 o uno de sus derivados reactivos y formar un enlace tioéter en un sitio de enlace a disulfuro presente en una parte bisagra del anticuerpo anti-TROP2. En este caso, se usa preferentemente un derivado reactivo del compuesto anti-TROP2. Particularmente, se prefiere un derivado reactivo obtenido reduciendo el anticuerpo anti-TROP2.

10 Los siguientes son compuestos más preferidos como intermedios de producción.

- (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 15 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 20 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-  
 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Entre el grupo anteriormente descrito de compuestos intermedios, un compuesto representado por la siguiente fórmula:

- 25 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), o  
 (maleimid-N-il)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

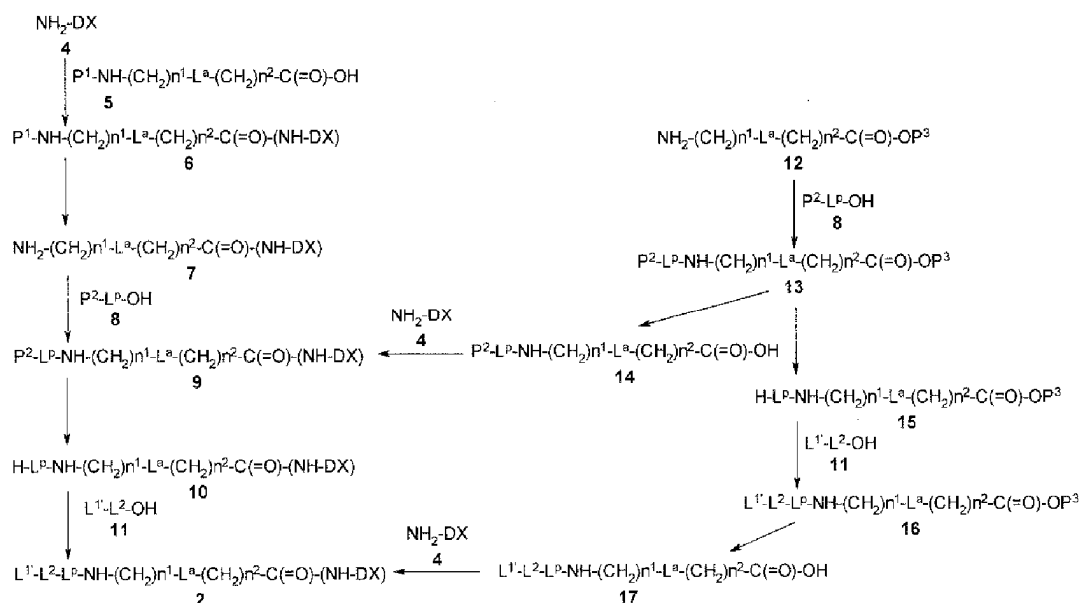
es un compuesto más preferido.

30 A fin de asegurar la cantidad del conjugado, se puede mezclar una pluralidad de conjugados obtenidos en condiciones de producción similares para tener un número equivalente de fármacos (por ejemplo, aproximadamente ± 1) para preparar nuevos lotes. En este caso, Las cantidades promedio de fármacos se encuentra entre las cantidades promedio de los fármacos en los conjugados antes de la mezcla.

## 2. Método de producción 2

35 Se puede producir el compuesto representado por la fórmula (2) como un intermedio utilizado en el método de producción anterior y una de sus sales farmacológicamente aceptables mediante el siguiente método, por ejemplo.

[Fórmula 22]



En la fórmula, L<sup>1</sup> representa un grupo maleimidilo, y P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, y P<sup>3</sup> representan cada uno un grupo protector.

El compuesto (6) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico (5) en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, haluro de ácido, o similares y haciendo reaccionar este con NH<sub>2</sub>-DX (4) o una de sus sales farmacológicamente aceptables en presencia de una base. NH<sub>2</sub>-DX (4) representa exatecán (nombre químico: (1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H, 12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H, 15H)-diona).

Se pueden emplear para la reacción reactivos de reacción y condiciones que se usan comúnmente para la síntesis de péptidos. Existen diversos tipos de ésteres activos. Por ejemplo, se pueden producir haciendo reaccionar fenoles tales como p-nitrofenol, N-hidroxi benzotriazol, N-hidroxi succinimida, o similares, con el ácido carboxílico (5) utilizando un agente de condensación tal como clorhidrato de N,N'-diclohexilcarbodiimida o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Además, puede producirse también el éster activo mediante reacción del ácido carboxílico (5) con trifluoroacetato de pentafluorofenilo o similar; una reacción del ácido carboxílico (5) con hexafluorofosfito de 1-benzotriazolil oxitripirrolidinofosfonio; una reacción del ácido carboxílico (5) con cianofosfonato de dietilo (método de saladó); una reacción del ácido carboxílico (5) con trifenilfosfina y disulfuro de 2,2'-dipiridilo (método de Mukaiyama); una reacción del ácido carboxílico (5) con un derivado de triazina tal como cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM); o similares. Además, la reacción se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, un método de haluro de ácido por el cual el ácido carboxílico (5) se trata con haluro ácido tal como cloruro de tionilo y cloruro de oxalilo en presencia de una base.

Haciendo reaccionar el éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, o haluro de ácido del ácido carboxílico (5) obtenido como anteriormente con el compuesto (4) en presencia de una base adecuada en un disolvente inerte a una temperatura de reacción de -78 °C a 150 °C, se puede producir el compuesto (6). Mientras tanto, "disolvente inerte" indica un disolvente que no inhibe una reacción diana para la cual se usa el disolvente.

Los ejemplos específicos de la base utilizada para cada etapa descrita anteriormente pueden incluir carbonato, alcóxido, hidróxido, o hidruro de un metal alcalino o un metal alcalinotérreo incluyendo carbonato de sodio, carbonato de potasio, etóxido de sodio, butóxido de potasio, hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidruro sódico, e hidruro potásico, una base organometálica representada por un alquil litio que incluye n-butil litio, dialquilamino litio incluyendo litio diisopropilamida; una base organometálica de bisililamina que incluye litio bis(trimetilsilil)amida; y una base orgánica que incluye una amina terciaria o un compuesto heterocíclico que contiene nitrógeno tal como piridina, 2,6-lutidina, colidina, 4-dimetilaminopiridina, trietilamina, N-metilmorfolina, diisopropiletilamina, y diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU).

Los ejemplos del disolvente inerte que se usa para la reacción de la presente invención incluyen un disolvente de hidrocarburo halogenado tal como diclorometano, cloroformo, y tetracloruro de carbono; un disolvente éter tal como tetrahidrofurano, 1,2-dimetoxietano, y dioxano; un disolvente de un hidrocarburo aromático, tal como benceno y tolueno; y un disolvente amida tal como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, y N-metilpirrolidin-2-ona. Además de ellos, se pueden usar un disolvente de sulfóxido tal como dimetil sulfóxido y sulfolano; un disolvente de cetona tal como acetona y metil etil cetona; y un disolvente alcohólico tal como metanol y etanol en algún caso. Además, estos disolventes se pueden mezclar para su uso.

Como para el grupo protector P<sup>1</sup> para el grupo del extremo amino del compuesto (6), un grupo protector para un grupo amino que se usa generalmente para la síntesis peptídica, se pueden usar, por ejemplo, un grupo *tert*-butiloxi carbonilo, un grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo, y un grupo benciloxi carbonilo. Los ejemplos de otros grupos protectores para un grupo amino pueden incluir un grupo alcanilo tal como un grupo acetilo; un grupo alcoxicarbonilo tal como un grupo metoxicarbonilo y un grupo etoxicarbonilo; un grupo arilmetoxi carbonilo tal como un grupo parametoxibenciloxi carbonilo, y un grupo para (u orto)nitrobenciloxi carbonilo; un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo y un grupo trifenil metilo; y un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo; y un grupo aril sulfonilo tal como un grupo 2,4-dinitrobenceno sulfonilo y un grupo ortonitrobenceno sulfonilo. El grupo protector P<sup>1</sup> se puede seleccionar dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de un compuesto que tiene un grupo amino que se va a proteger.

Desprotegiendo el grupo protector P<sup>1</sup> para el grupo del extremo amino del compuesto (6) obtenido, se puede producir el compuesto (7). Para esta desprotección, se pueden seleccionar los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector.

El compuesto (9) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico peptídico (8) que tiene el extremo N protegido con P<sup>2</sup> en un éster activo, mezclado con un anhídrido de ácido y haciendo reaccionar este con el compuesto (7) obtenido. Las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (8) y el compuesto (7) se pueden seleccionar de forma adecuada y utilizarse a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P<sup>2</sup> se puede seleccionar de forma adecuada y utilizarse a partir de aquellos descritos para el grupo protector del compuesto (6), y la selección se puede realizar basándose en, por ejemplo, las propiedades del compuesto que tiene un grupo amino que se va a proteger. Como se usa generalmente para la síntesis peptídica, repitiendo secuencialmente la reacción y la desprotección del aminoácido o péptido que constituye el ácido carboxílico peptídico (8) para el alargamiento, se

puede producir también el compuesto (9).

Desprotegiendo el grupo protector  $P^2$  para el extremo amino del compuesto (9) obtenido, se puede producir el compuesto (10). Para esta desprotección, se pueden seleccionar los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector.

5 Es posible producir el compuesto (2) derivatizando el ácido carboxílico (11) en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, haluro de ácido, o similares y haciendo reaccionar este con el compuesto (10) obtenido. Las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (11) y el compuesto (10) se pueden seleccionar de forma adecuada y utilizarse a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

10 Se puede producir también el compuesto (9) mediante el siguiente método, por ejemplo.

15 El compuesto (13) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico peptídico (8) que tiene el extremo N protegido con  $P^2$  en un éster activo, anhídrido de ácido mezclado, o similares y haciendo reaccionar este en presencia de una base con el compuesto de amina (12) que tiene el grupo carboxi protegido con  $P^3$ . Las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (8) y el compuesto (12) se pueden seleccionar de forma adecuada y utilizarse a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

El grupo protector  $P^2$  para el grupo amino del compuesto (13) puede protegerse con un grupo protector que se usa comúnmente.

20 Específicamente, los ejemplos del grupo protector para un grupo hidroxilo incluyen un grupo alcóximetilo tal como un grupo metóximetilo; un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo, un grupo 4-metoxibencilo, y un grupo trifenilmetilo; un grupo alcanóilo tal como un grupo acetilo; un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo; y un grupo sililo tal como un grupo *tert*-butil difenilsililo. Se puede proteger un grupo carboxi, por ejemplo, como un éster con un grupo alquilo tal como un grupo metilo, grupo etilo, y un grupo *tert*-butilo, un grupo alilo, o un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo. Los ejemplos del grupo protector para el grupo amino incluyen, por ejemplo, un grupo alquilo carbonilo tal como un grupo *tert*-butiloxi carbonilo, un grupo metoxicarbonilo, y un grupo etoxicarbonilo; un grupo aliloxicarbonilo, o un grupo arilmetoxi carbonilo tal como un grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo, un grupo benciloxi carbonilo, un grupo parametoxibenciloxi carbonilo y un grupo para (u orto)nitrobenciloxi carbonilo; un grupo alcanóilo tal como un grupo acetilo; un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo y un grupo trifenil metilo; un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo; y un grupo aril sulfonilo tal como un grupo 2,4-dinitrobenceno sulfonilo o un grupo ortonitrobenceno sulfonilo.

25 Como para el grupo protector  $P^3$  para un grupo carboxi, un grupo protector comúnmente utilizado como un grupo protector para un grupo carboxi en química sintética orgánica, en particular, se puede usar la síntesis peptídica. Los ejemplos específicos incluyen ésteres con un grupo alquilo tal como un grupo metilo, un grupo etilo, o un *tert*-butilo, ésteres de alilo, y ésteres de bencilo, y el grupo protector puede seleccionarse de forma adecuada a partir de los grupos protectores anteriormente descritos. En tal caso, se prefiere que el grupo protector para un grupo amino y el grupo protector para un grupo carboxi puedan ser aquellos que se retiran preferentemente mediante un método diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que  $P^2$  es un grupo *tert*-butiloxi carbonilo y  $P^3$  es un grupo bencilo. Los grupos protectores pueden seleccionarse a partir de los anteriormente mencionados dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de un compuesto que tiene un grupo amino y un grupo carboxi que se va a proteger. Para la eliminación de los grupos protectores, se pueden seleccionar los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector.

35 Desprotegiendo el grupo protector  $P^3$  para el grupo carboxi del compuesto (13) obtenido, se puede producir el compuesto (14). Para esta desprotección, se seleccionan los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector.

45 El compuesto (9) puede producirse derivatizando el compuesto (14) obtenido en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, haluro de ácido, o similares y haciendo reaccionar este con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, se pueden usar también los reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos, y se pueden seleccionar adecuadamente las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para la reacción a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

50 Se puede producir también el compuesto (2) mediante el siguiente método, por ejemplo.

Desprotegiendo el grupo protector  $P^2$  para el grupo amino del compuesto (13), se puede producir el compuesto (15). Para esta desprotección, se pueden seleccionar los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector.

55 El compuesto (16) puede producirse derivatizando el derivado de ácido carboxílico (11) en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, haluro de ácido, o similares y haciendo reaccionar este con el compuesto (15) obtenido en presencia de una base. Las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para formar un

enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (11) y el compuesto (15) se pueden seleccionar de forma adecuada y utilizarse a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

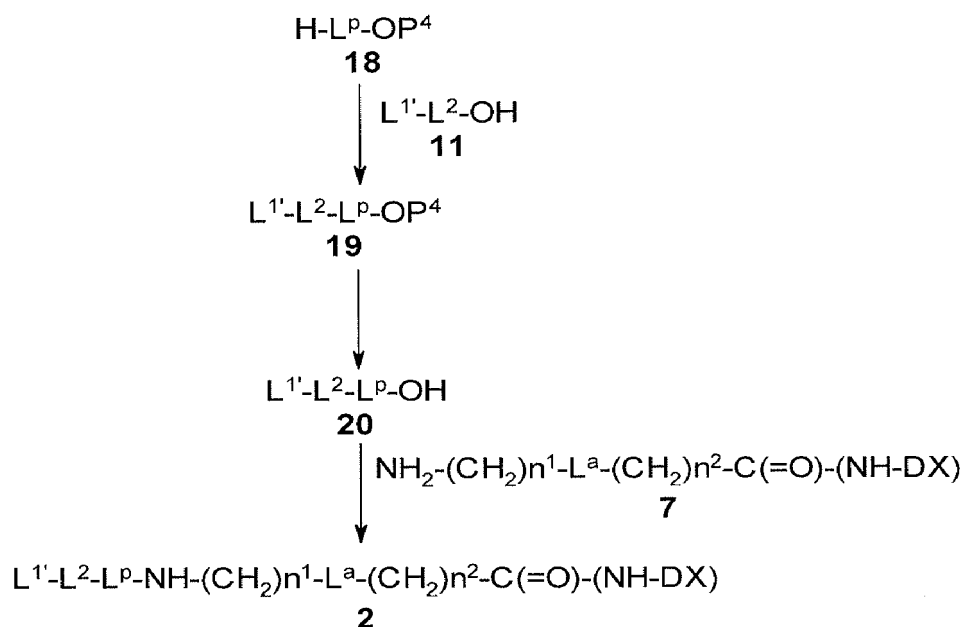
5 Desprotegiendo el grupo protector para el grupo carboxi del compuesto (16) obtenido, se puede producir el compuesto (17). Esta desprotección se puede llevar a cabo de forma similar a la desprotección en el grupo carboxi para producir el compuesto (14).

10 El compuesto (2) puede producirse derivatizando el compuesto (17) en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, haluro de ácido, o similares y haciendo reaccionar este con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, se pueden usar también reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos, y se pueden seleccionar adecuadamente las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para la reacción a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

### 3. Método de producción 3

Se puede producir también el compuesto representado por la fórmula (2) de un intermedio mediante el siguiente método.

[Fórmula 23]



15 En la fórmula, L<sup>1'</sup> corresponde a L<sup>1</sup> que tiene una estructura en la que el extremo se convierte en un grupo maleimidilo, y P<sup>4</sup> representa un grupo protector.

20 El compuesto (19) puede producirse derivatizando el compuesto (11) en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, o similares y haciendo reaccionar este en presencia de una base con el ácido carboxílico peptídico (18) que tiene el extremo C protegido con P<sup>4</sup>. Las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para formar un enlace peptídico entre el ácido carboxílico peptídico (18) y el compuesto (11) se pueden seleccionar de forma adecuada y utilizarse a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P<sup>4</sup> para el grupo carboxi del compuestos (18) se puede seleccionar adecuadamente a partir del grupo protector descrito anteriormente.

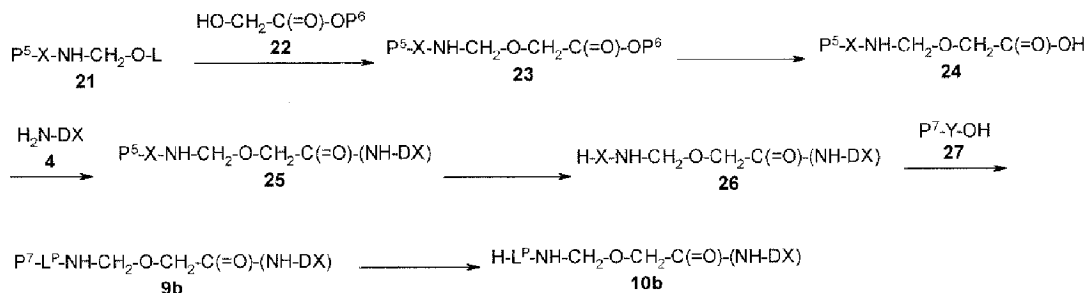
25 Desprotegiendo el grupo protector para el grupo carboxi del compuesto (19) obtenido, se puede producir el compuesto (20). Esta desprotección se puede llevar a cabo de forma similar a la desprotección en el grupo carboxi para producir el compuesto (14).

30 El compuesto (2) puede producirse derivatizando el compuesto (20) obtenido en un éster activo, mezclado con un anhídrido de ácido y haciendo reaccionar este con el compuesto (7). Para la reacción, se pueden usar también reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos, y se pueden seleccionar adecuadamente las condiciones de reacción, reactivos, bases, y disolventes inertes utilizados para la reacción a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

### 4. Método de producción 4

A continuación, en el presente documento, se describe en detalle el método para producir el compuesto (10b) que tiene  $n^1 = 1$ ,  $L^a = O$  en el intermedio de producción (10) descrito en el Método de producción 2. El compuesto representado por la fórmula (10b), una de sus sales o solvatos se puede producir de acuerdo con el siguiente método, por ejemplo.

5 [Fórmula 24]



En la fórmula,  $L^p$  es como se ha definido anteriormente, L representa un grupo acilo que es un grupo alcanóilo tal como un grupo acetilo o un grupo aloílo tal como un grupo benzoílo, un átomo de hidrógeno, o similares, X e Y representan cada uno un oligopéptido que consiste en 1 a 3 aminoácidos,  $P^5$  y  $P^7$  representan cada uno un grupo protector para un grupo amino, y  $P^6$  representa un grupo protector para un grupo carboxi.

Se puede producir un compuesto representado por la fórmula (21) utilizando o aplicando el método descrito en la patente japonesa abierta a consulta n.º. 2002-60351 o en la referencia (J. Org. Chem., Vol. 51, páginas 3196, 1986), y, llevando a cabo la eliminación de los grupos protectores o la modificación de los grupos funcionales, si es necesario. Como alternativa, se puede obtener también tratando un aminoácido con un grupo protegido en el extremo amino o una amida ácida de un oligopéptido con un grupo amino protegido con un aldehído o cetona.

Haciendo reaccionar (21) con el compuesto (22) que tiene un grupo hidroxilo a una temperatura que varía desde las condiciones de temperatura por debajo de la temperatura de enfriamiento a la temperatura ambiente en un disolvente inerte en presencia de un ácido o una base, se puede producir el compuesto (23).

Los ejemplos del ácido que se puede usar aquí pueden incluir ácido inorgánico tal como ácido fluorhídrico, cloruro de hidrógeno, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y ácido bórico; un ácido orgánico tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido paratoluenosulfónico, y ácido metanosulfónico; y un ácido de Lewis tal como tetrafluoroborato, cloruro de zinc, cloruro de estaño, cloruro de aluminio, y cloruro de hierro. Entre ellos, son preferibles los ácidos sulfónicos, particularmente, ácido paratolueno sulfónico. Como para la base, se puede seleccionar de forma adecuada y utilizarse una cualquiera de las bases anteriormente mencionadas. Sus ejemplos preferidos incluyen un alcóxido de metal alcalino tal como *tert*-butóxido de potasio; un hidróxido de metal alcalino tal como hidróxido sódico e hidróxido potásico; un hidruro de metal alcalino tal como hidruro sódico e hidruro potásico; una base organometálica representada por dialquilamino litio tal como litio diisopropilamida; y una base organometálica de bissililamina que incluye litio bis(trimetilsilil)amida. Los ejemplos del disolvente que se va a usar para la reacción incluyen un disolvente de éter tal como tetrahidrofurano y 1,4-dioxano; y un disolvente de un hidrocarburo aromático, tal como benceno y tolueno. Aquellos disolventes se pueden preparar como una mezcla con agua. Además, el grupo protector para un grupo amino, como se ilustra por  $P^5$  no está particularmente limitado si es un grupo comúnmente utilizado para la protección de un grupo amino. Los ejemplos representativos incluyen los grupos protectores para un grupo amino que se describen en el Método de producción 2. Sin embargo, En la presente reacción, puede existir un caso en el que se elimine por escisión el grupo protector para un grupo amino, como se ilustra por  $P^5$ . En tal caso, es necesario llevar a cabo una reacción con un reactivo adecuado para proteger un grupo amino como puede requerirse para introducir el grupo protector de nuevo.

Se puede producir el compuesto (24) eliminando el grupo protector  $P^6$  del compuesto (23). En el presente documento, los ejemplos representativos del grupo protector para un grupo carboxi, como se ilustra por  $P^6$  se describen en un Método de producción 2, y se puede seleccionar uno adecuado a partir de los mismos. En el compuesto (23), es deseable que el grupo protector  $P^5$  para un grupo amino y el grupo protector  $P^6$  para un grupo carboxi sean los grupos protectores que se puedan eliminar mediante un método diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que  $P^5$  es un grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo y  $P^6$  es un grupo bencilo. Los grupos protectores se pueden seleccionar dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de un compuesto que tiene un grupo amino y un grupo carboxi que se va a proteger. Para la eliminación de los grupos protectores, se seleccionan los reactivos y condiciones dependiendo del grupo protector.

El compuesto (26) puede producirse derivatizando el ácido carboxílico (24) en un éster activo, mezclado con anhídrido de ácido, haluro de ácido, o similares y haciendo reaccionar este con el compuesto (4) o una de sus sales farmacológicamente aceptables para producir el compuesto (25) seguido por la eliminación del grupo protector  $P^5$

del compuesto (25) obtenido. Para la reacción entre el compuesto (4) y el ácido carboxílico (24) y la reacción para eliminar el grupo protector P<sup>6</sup>, se pueden usar los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el Método de producción 2.

5 Se puede producir el compuesto (10b) haciendo reaccionar el compuesto (26) con un aminoácido que tiene el grupo del extremo N protegido o el oligopéptido (27) que tiene el grupo amino protegido para producir el compuesto (9b) y eliminar el grupo protector P<sup>7</sup> del compuesto (9b) obtenido. El grupo protector para un grupo amino, como se representa por P<sup>7</sup> no está particularmente limitado si es un grupo generalmente utilizado para la protección de un grupo amino. Sus ejemplos representativos incluyen los grupos protectores para un grupo amino que se describen en el Método de producción 2. Para eliminar el grupo protector, se seleccionan los reactivos y condiciones  
10 dependiendo del grupo protector. Para la reacción entre el compuesto (26) y el compuesto (27), se pueden emplear los reactivos y condiciones de reacción que se usan comúnmente para la síntesis de péptidos. El compuesto (10b) producido por el método anteriormente mencionado se puede derivatizar en el compuesto (1) de la presente invención de acuerdo con el método descrito anteriormente.

15 El conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención, cuando se deja al aire o se recristaliza, por ejemplo, para la purificación, puede absorber humedad para tener adsorción del agua o a la vez en un hidrato, y dicho compuesto y sal que contienen agua se incluyen también en la presente invención.

Se incluye también un compuesto marcado con diversos isótopos radioactivos o no radioactivos en la presente invención. Uno o más átomos que constituyen el conjugado de fármaco anticuerpo de la presente invención pueden  
20 contener un isótopo atómico en una relación no natural. Los ejemplos de los isótopos atómicos incluyen deuterio (<sup>2</sup>H), tritio (<sup>3</sup>H), yodo-125 (<sup>125</sup>I) y carbono-14 (<sup>14</sup>C). Además, el compuesto de la presente invención puede marcarse de forma radioactiva con un isótopo radioactivo tal como tritio (<sup>3</sup>H), yodo-125 (<sup>125</sup>I), carbono-14 (<sup>14</sup>C), cobre-64 (<sup>64</sup>Cu), circonio-89 (<sup>89</sup>Zr), yodo-124 (<sup>124</sup>I), flúor-18 (<sup>18</sup>F), indio-111 (<sup>111</sup>I), carbono-11 (<sup>11</sup>C) y yodo-131 (<sup>131</sup>I). El compuesto marcado con un isótopo radioactivo es útil como un agente terapéutico o profiláctico, un reactivo para la investigación tal como un reactivo de ensayo y un agente para el diagnóstico tal como un agente de diagnóstico por  
25 imágenes *in vivo*. Sin estar relacionado con la radioactividad, cualquier tipo variante de isótopo del conjugado de fármaco anticuerpo de la presente invención está comprendido en el alcance de la presente invención.

#### [Fármacos]

el conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención presenta una actividad citotóxica contra  
30 células cancerosas, y por tanto, se puede usar como un fármaco, particularmente como un agente terapéutico y/o un agente profiláctico para el cáncer.

Es decir, el conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención se puede usar selectivamente como un fármaco para la quimioterapia, que es un método principal para tratar el cáncer, y como resultado, puede retrasar el desarrollo de las células cancerosas, inhibir su crecimiento, y destruir además sus células cancerosas. Esto puede permitir a los pacientes con cáncer estar libres de los síntomas producidos por el cáncer conseguir la  
35 mejora de la QOL de los pacientes con cáncer y logra un efecto terapéutico manteniendo las vidas de los pacientes con cáncer. Incluso si el conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención no lleva a cabo la destrucción de las células cancerosas, puede conseguir una QOL mayor de los pacientes con cáncer consiguiendo a la vez su supervivencia a largo plazo, inhibiendo o controlando el crecimiento de las células cancerosas.

40 En dicho tratamiento farmacológico, se puede usar un fármaco solo así como un fármaco en combinación con un tratamiento adicional en una terapia auxiliar y se puede combinar con una operación quirúrgica, radioterapia, tratamiento hormonal, o similar. Además, se puede usar también como fármaco para un tratamiento farmacológico en una terapia neoadyuvante.

Además del uso terapéutico como se ha descrito anteriormente, un efecto de suprimir el crecimiento de células cancerosas metastásicas diminutas y destruirlas adicionalmente mediante la unión a estas células cancerosas puede  
45 esperarse también en virtud de la propiedad de unión del anticuerpo con el antígeno. Particularmente, cuando se confirma la expresión TROP2 se confirma en células primarias cancerosas, se puede esperar la inhibición de la metástasis cancerosa o un efecto profiláctico administrando el conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención. Por ejemplo, un efecto de inhibir y destruir células cancerosas en un fluido corporal en el curso de la metástasis o un efecto de, por ejemplo, se puede esperar inhibir y destruir células cancerosas diminutas  
50 inmediatamente después del implante en cualquier tejido. Además, se puede esperar la inhibición de la metástasis del cáncer o un efecto profiláctico, particularmente, tras la eliminación quirúrgica del cáncer. En consecuencia, se puede esperar un efecto de inhibición de la metástasis cancerosa.

El conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención puede esperarse que ejerza un efecto  
55 terapéutico mediante la administración como una terapia sistémica a pacientes, y adicionalmente, mediante la administración local a tejidos cancerosos.

Los ejemplos del tipo de cáncer contra el cual puede utilizarse el conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 incluyen el cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de

vejiga, cáncer gástrico, cáncer de cuello de útero, cáncer de cabeza y cuello, o cáncer de esófago, sin embargo, no se limita a ellos siempre que se una célula cancerosa que lo exprese, en una célula cancerosa como parte del tratamiento, una proteína que el anticuerpo en el conjugado de fármaco-anticuerpo pueda reconocer.

5 El conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención se puede administrar preferentemente a un mamífero, pero se administra más preferentemente a un ser humano.

Las sustancias utilizadas en una composición farmacéutica que contiene el conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención se puede seleccionar de forma adecuada y aplicarse a partir de los aditivos e formulación o similares que se usan generalmente en la técnica, a la vista de la concentración de la dosificación o la administración.

10 El conjugado de fármaco anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención se puede administrar como una composición farmacéutica que contiene al menos un ingrediente farmacéuticamente adecuado. Por ejemplo, la composición farmacéutica anterior contiene normalmente al menos un transportador farmacéutico (por ejemplo, líquido esterilizado). En el presente documento, el líquido incluye, por ejemplo, agua y aceite (crudo de petróleo y aceite de origen animal, origen vegetal, u origen sintético). El aceite puede ser, por ejemplo, aceite de cacahuete, 15 aceite de soja, aceite mineral, o aceite de sésamo. El agua es el transportador más típico cuando la composición farmacéutica anterior se administra por vía intravenosa. Se puede usar también solución salina, una solución acuosa de dextrosa, y una solución acuosa de glicerol como un transportador líquido, en particular, para una solución de inyección. Se conoce en la técnica un vehículo farmacéutico adecuado. Si se desea, la composición anterior puede contener también una cantidad traza de un agente hidratante, un agente emulsionante, o un agente tamponante del pH. Los ejemplos de transportadores farmacéuticos adecuados se desvelan en "Remington's Pharmaceutical 20 Sciences" de E. W. Martin. Las formulaciones corresponden a un modo de administración.

Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar el conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención. Los ejemplos de la ruta de administración incluyen las rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, y subcutánea, pero sin limitarse a los mismos. La 25 administración puede realizarse mediante inyección o inyección en bolo, por ejemplo. De acuerdo con una realización específica preferida, la administración del conjugado de fármaco-anticuerpo se lleva a cabo mediante inyección. La administración parenteral es una ruta de administración preferida.

De acuerdo con una realización representativa, se prescribe la composición farmacéutica, como una composición farmacéutica adecuada para la administración intravenosa a un ser humano, de acuerdo con los procedimientos 30 convencionales. La composición para la administración intravenosa es normalmente una solución en una solución acuosa tamponada estéril e isotónica. En caso necesario, el fármaco puede contener un agente solubilizante y anestésicos locales para aliviar el dolor en el sitio de inyección (por ejemplo, lignocaina). En general, el ingrediente anterior se proporciona individualmente como uno cualquiera de un polvo liofilizado o como un concentrado anhidro contenido en un recipiente que se obtiene precintando una ampolla o una bolsita que tiene una cantidad del principio 35 activo o como una mezcla en una forma en dosis unitaria. Cuando el fármaco está en la forma de administración mediante inyección, se puede administrar a partir de una botella de inyección que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando el fármaco se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril o solución salina para inyección de tal manera que los ingredientes anteriormente mencionados se premezclan entre sí antes de la administración.

40 La composición farmacéutica de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que contiene solo el conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente solicitud o una composición farmacéutica que contiene el conjugado de fármaco anticuerpo anti-TROP2 y al menos un agente de tratamiento del cáncer diferente que el del conjugado. El conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 de la presente invención se puede administrar con otro 45 agente de tratamiento del cáncer. El efecto anticanceroso puede potenciarse de acuerdo con ello. Otro agente anticanceroso utilizado para dicho fin puede administrarse a un individuo simultáneamente con, por separado de, o posteriormente al conjugado de fármaco anticuerpo, y se puede administrar aunque variando el intervalo de administración para cada uno. Los ejemplos del agente de tratamiento del cáncer incluyen abraxano, paclitaxel, cisplatino, gemcitabina, irinotecan (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinorelbina, los fármacos descritos en la publicación internacional n.º WO 2003/038043, análogos de LH-RH (leuprorelina, goserelina, o similares), fosfato 50 de estramustina, antagonista del estrógeno (tamoxifeno, raloxifeno, o similares), y un inhibidor de la aromataasa (anastrozol, letrozol, exemestano, o similares), aunque no de forma limitativa siempre que sea un fármaco que tenga una actividad antitumoral.

Se puede formular la composición farmacéutica en una formulación para liofilización o una formulación líquida como una formulación que tiene una composición deseada y una pureza requerida. Cuando se formula como una 55 formulación para liofilización, puede ser una formulación que contiene aditivos de formulación adecuados que se usan en la técnica. También para una formulación líquida, se puede formular como una formulación líquida que contiene diversos aditivos de formulación que se usan en la técnica.

La composición y concentración de la composición farmacéutica puede variar dependiendo del método de administración. Sin embargo, el conjugado de fármaco-anticuerpo anti-TROP2 contenido en la composición



5 farmacéutica de la presente invención puede presentar el efecto farmacéutico incluso a una pequeña dosificación cuando el conjugado de fármaco-anticuerpo tiene mayor afinidad por un antígeno, es decir, mayor afinidad (= menor valor de Kd) en términos de la constante de disociación (es decir, el valor Kd) para el antígeno. Por lo tanto, para determinar la dosificación del conjugado de fármaco-anticuerpo, la dosificación puede determinarse a la vista de una situación que se refiere a la afinidad entre el conjugado de fármaco-anticuerpo y el antígeno. Cuando el conjugado de fármaco-anticuerpo de la presente invención se administra a un ser humano, por ejemplo, aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg se puede administrar una vez o administrarse vacías veces con un intervalo de una vez durante 1 a 180 días.

### **Ejemplos**

10 La presente invención se describe específicamente a la vista de los ejemplos que se muestran a continuación. Sin embargo, la presente invención no se limita a los mismos. Además, esto no debe interpretarse de ninguna modo en una manera limitada. Además, a menos que se describa específicamente lo contrario, el reactivo, el disolvente, y e material de partida descrito en la memoria descriptiva puede obtenerse fácilmente a partir de un suministrador comercial.

#### **[Ejemplo 1: Inmunización de un ratón y obtención del hibridoma]**

1-1) Preparación de células que se van a usar en la inmunización de un ratón

5  $5 \times 10^6$  células NCI-H322 (línea de células de cáncer de pulmón no microcítico humano, ATCC CRL-5806; ATCC: American Type Culture Collection) se cultivaron en un medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640) (10 ml) durante 5 días, a continuación se recuperaron, se lavaron con PBS (solución salina tamponada ) dos veces, y se volvieron a suspender en PBS (500  $\mu$ l).

1-2) Inmunización del ratón

25 Para la primera inmunización, cada ratón BALB/c (6 semanas de edad) se inmunizó por vía intraperitoneal con células NCI-H322 ( $1 \times 10^7$  células). Para la segunda a quinta inmunizaciones, se inmunizó el ratón por vía intraperitoneal con  $1 \times 10^6$  células NCI-H322 a intervalos de 1 semana. Para la sexta inmunización (final), se inmunizó el ratón a través de la vena de la cola e intraperitonealmente con las células NCI-H322 a  $1 \times 10^6$  células/200  $\mu$ l PBS por cada ruta. Se escindieron los esplenocitos 3 días después de la inmunización final.

1-3) Preparación de esplenocitos de un ratón inmunizado

30 Se cortó el bazo del ratón inmunizado, a continuación se molió y se suspendió en medio RPMI 1640 FBS al 10 % (suero de feto de bovino) (+). La suspensión celular se pasó a través de un filtro de células (100  $\mu$ m, BD Falcon) y a continuación se centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se descartó el sobrenadante. Se añadió una solución Tris-NH<sub>4</sub>Cl (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.83 % NH<sub>4</sub>Cl; 10 ml) al residuo, seguido por tratamiento a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadió un medio RPMI 1640 FBS(+) (10 ml) a la suspensión celular, y se pasó la mezcla a través de un filtro de células y a continuación se centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, y se volvieron a suspender los esplenocitos en un medio RPMI 1640 FBS(-) (10 ml).

1-4) Preparación de células de mieloma

40 se recuperaron células P3U1 (línea de células de mieloma de ratón) y se centrifugaron a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadió una solución de EDTA (0,02 %) (10 ml) a las células P3U1, seguido por tratamiento a 37 °C durante 5 minutos. La suspensión de células P3U1 se centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se volvió a suspender en un medio RPMI 1640 FBS(-) (10 ml).

1-5) Fusión celular

45 Los esplenocitos y las células de mieloma se mezclaron a una relación de 5:1 y se centrifugaron (1200 rpm, 5 minutos). Las células obtenidas en la fracción precipitada se desprendieron bien y a continuación se añadió gradualmente a lo anterior polietilenglicol-4000 (PEG-4000; 1 ml) durante aproximadamente 1 minuto con agitación. Después, se añadió medio RPMI (1 ml) al fluido que contenía las células varias veces con un intervalo de 1 minuto, y a continuación se añadió un medio RPMI a lo anterior para ajustar la cantidad total a 50 ml. Se centrifugó la suspensión celular (900 rpm, 5 minutos), y las células obtenidas en la fracción precipitada se desprendieron suavemente y a continuación se suspendieron suavemente en un medio HAT (medio PRMI 1640 suplementado con suero de feto de bovino al 10 %) y suplemento de medio HAT; 100 ml). Se dispensó la suspensión a 200  $\mu$ l/pocillo a una placa de 96 pocillo para el cultivo y se cultivó hasta una confluencia del 50 % en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C.

1-6) Cribado del hibridoma utilizando variantes del adenovirus FZ33

Se sembraron las células NCI-H322 a  $5 \times 10^3$  células/pocillo a una placa de 96 pocillo y se cultivaron a 37 °C durante

48 horas. Se lavaron las células con 150 µl/pocillo de PBS dos veces y se añadió el sobrenadante de cada cultivo de hibridoma (50 µl) a cada pocillo y se hizo reaccionar a 4 °C durante 1 hora. Se lavaron las células con 150 µl/pocillo de PBS dos veces. Un adenovirus Ax3CAZ3-FZ33 (adenovirus que expresa la β-galactosidasa modificado con fibra de Z33 con el fin de unirse a un anticuerpo (véase publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2012/0237518)) se diluyó con un medio RPMI1640(-) a una concentración de  $3 \times 10^6$  vp/100 µl ( $1 \times 10^3$  vp/célula), y esta solución diluida se añadió a lo anterior a 100 µl/pocillo. Tras una reacción a 4 °C durante 1 hora, las células se lavaron con 150 µl/pocillo de PBS dos veces. Se añadió un medio RPMI1640 FBS(+) a lo anterior a 100 µl/pocillo, y se cultivaron las células a 37 °C durante 24 horas. Las células NCI-H322 tratadas con el ensayo del gen indicador β-Gal utilizando Galacto-Light Plus Reporter Gene Assay System (Applied Biosystems, Inc.) se lavaron con 200 µl/pocillo de PBS. se añadió solución de lisis a las anteriores a 50 µl/pocillo, y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Este lisado celular (10 µl) se diluyó 100 veces con el diluyente del tampón de reacción Galacton-Plus Galacto, a continuación se añadió a un micropocillo blanco de una placa SH de 96 pocillos (Nunc/Thermo Fisher Scientific, Inc.) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió Acelerador II al anterior a 150 µl/pocillo. Se midió la quimioluminiscencia durante 5 segundos usando un contador multimarca Wallac 1420 ARVosx (PerkinElmer, Inc.), y se indicó la dosis infectiva del virus en las células NCI-H322 con el valor promedio por segundo como URL (cantidad de luminiscencia). En el cribado del grupo del hibridoma llevado a cabo de esta manera, un clon cuyo valor de medición (URL) era de 5000 URL o mayor se seleccionó a partir del grupo completo (mínimo: 1383 URL, promedio: 10914 URL, máximo: 78746 URL). En primer lugar, como cribado primario, se seleccionaron 81 pocillos positivos a partir de 960 pocillos de hibridoma obtenidos mediante una fusión celular. Como cribado de validación, se llevó a cabo además el ensayo por duplicado mediante la misma estrategia que en el cribado primario. Cuando se consideró como positivo un pocillo que presentó un valor de medición de 5000 URL o más en ambos ensayos, se seleccionaron 52 pocillos positivos a partir de los 81 pocillos obtenidos en el cribado primario. Se subclonaron los clones seleccionados 2 a 4 veces para establecer 44 líneas de células de hibridoma monoclonales.

#### 25 [Ejemplo 2: Purificación del anticuerpo a partir del hibridoma]

Pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano; 0,5 ml) se administró por vía intraperitoneal por adelantado a cada ratón o ratón atímico de 8 a 10 semanas de edad, que se aumentó a continuación durante 2 semanas. Cada hibridoma productor de anticuerpos monoclonales obtenido en el Ejemplo 1 se inyectó intraperitonealmente al ratón. después de 10 a 21 días, se dejó que el hibridoma produjera canceración ascítica, y a continuación se recogió el fluido ascítico. El fluido ascítico obtenido se centrifugó para eliminar la materia sólida. Después, los anticuerpos se purificaron mediante salado con 40 a 50 % de sulfato de amonio, un método de precipitación del ácido caprílico, una columna de DEAE-Sefarosa, y una columna de proteína G, y se recogieron las fracciones de IgG o IgM y se utilizaron como anticuerpos monoclonales purificados.

#### [Ejemplo 3: Identificación del antígeno al cual se une el anticuerpo producido mediante hibridoma]

35 Se identificó un antígeno para TINA1, un anticuerpo producido por el hibridoma preparado en el Ejemplo 2.

##### 3-1) Inmunoprecipitación de proteína superficial celular marcada con biotina utilizando el anticuerpo TINA1

se recuperaron  $5 \times 10^6$  NCI-H322 células y se lavaron con PBS tres veces. EZ-Link Sulfo-NHS-Biotina (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Inc.) se suspendió en PBS a una concentración de 0,1 mg/ml. Las células NCI-H322 se centrifugaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en una solución de biotina/PBS, a continuación se lavaron con una solución de glicina/PBS 100 mM (25 ml) dos veces, y a continuación se lavaron con PBS (25 ml) tres veces. Las células lavadas de esta manera se volvieron a suspender en un tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NP-40 al 1 % + Inhibidor de la Proteasa, 1 comprimido/50 ml de EDTA libre completo (Hoffmann-La Roche Ltd.); 2 ml) y se trataron a 4 °C durante 30 minutos. Proteína G Sefarosa/tampón de lisis (suspensión al 50 %; 30 µl) obtenido sustituyendo un tampón de Proteína G Sefarosa (Proteína G Sefarosa 4 Fast Flow (GE Healthcare Japan Corporation)) con un tampón de lisis se añadió al lisado celular, y se centrifugó la mezcla a 4 °C durante 1 hora y a continuación se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos para recuperar un sobrenadante. Se añadió el anticuerpo TINA1 (3 µg) al sobrenadante, y la mezcla se centrifugó a 4 °C durante 1 hora. Después, Proteína G Sefarosa/tampón de lisis (suspensión al 50 %; 60 µl) se añadió al anterior, y la mezcla se centrifugó a 4 °C durante 2 horas. Proteína G Sefarosa se lavó con un tampón de lisis (1 ml) seis veces y a continuación se volvió a suspender en 1 x tampón de muestra SDS/2-ME al 5 % (2-mercaptoetanol) tampón (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8 a 25 °C), SDS al 2 % (p/v), glicerol al 10 %, y rojo fenol al 0,01 % (p/v)). Se trató la suspensión a 100 °C durante 5 minutos, y a continuación se recuperó la solución y se usó como una muestra para SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida).

##### 3-2) SDS-PAGE y transferencia Western

55 La muestra de SDS-PAGE preparada en 3-1) se sometió a electroforesis a 20 mA utilizando geles Ready J al 5-20 % (Bio-Rad Laboratories, Inc.) y a continuación se inmunoborraron a 0,1 mA/cm<sup>2</sup> desde el gel a la membrana. La membrana se lavó con PBS-T (PBS(-)-0,05 % Tween 20) durante 5 minutos y a continuación se bloqueó durante 1 hora. Se lavó la membrana con PBS-T durante 5 minutos tres veces y a continuación se hizo reaccionar con un conjugado de Estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences Corp.; diluido 2000 veces con

PBS-T para su uso) durante 1 hora. Se lavó la membrana con PBS-T durante 10 minutos cuatro veces, y a continuación se detectó una banda diana utilizando reactivos de detección ECL para la transferencia western (Amersham Biosciences Corp.) e Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences Corp.). Las células NCI-H322 marcadas con biotina mediante los procedimientos del Ejemplo 3-1) se sometieron a inmunoprecipitación con un anticuerpo KCI7A3 se encontró ya mediante espectrometría de masas que era TROP2, o el anticuerpo TINA1, y los productos inmunoprecipitados obtenidos se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia Western, en presencia o ausencia de DTT. En cualquier caso de utilización del anticuerpo KCI7A3 o el anticuerpo TINA1, se detectó una banda a un peso molecular de 46 kDa en ausencia de DTT, y se detectó una banda a un peso molecular de 37 kDa en las muestras suplementadas con DTT.

### 3-3) Análisis FACS

Debido a que se predijo que el antígeno del anticuerpo TINA1 era TROP2 a partir del modelo de banda, se llevó a cabo el análisis de expresión en exceso mediante transferencia génica del ADNc sin espectrometría de masas. Como resultado del análisis FACS, el anticuerpo TINA1 presentó una fuerte respuesta positiva en células CHOK1 que expresan TROP2 humano, indicando que el antígeno del anticuerpo TINA1 es TROP2. Se llevó a cabo un análisis FACS de forma similar utilizando una línea de células PC14 de cáncer de pulmón, una línea de células NCI-H322 de cáncer de pulmón, una línea de células NCI-H2122 de cáncer de pulmón, una línea de células LCAM1 de cáncer de pulmón, una línea de células LC2/ad de cáncer de pulmón/, una línea de células MIAPaCa2 de cáncer de páncreas, una línea de células PK-1 de cáncer de páncreas, una línea de células PC3 de cáncer de próstata, una línea de células HCT116 de cáncer colorrectal, una línea de células A375 de melanoma, una línea de células SKOV3 de cáncer de ovario, una línea de células RPMI8226 de cáncer de tumor hematopoyético, una línea de células K562 de cáncer de tumor hematopoyético, PBMC (células mononucleares de sangre periférica humana), y plaquetas humanas. Todas las líneas de células de cáncer de pulmón examinadas eran positivas para TROP2, y fueron positivas para PC3, PK1, y SKOV3 como las líneas de células excepto para las de cáncer de pulmón. Por otra parte, todas las células sanguíneas humanas fueron negativas.

### [Ejemplo 4: Medición de la actividad de internalización del anticuerpo]

#### 4-1) Sistema de evaluación de la actividad de internalización del anticuerpo

Se produjo una proteína DT3C de fusión recombinante para el fin de medir la actividad de internalización y la actividad como inmunotoxina de un anticuerpo. Esta DT3C es una proteína que tiene un dominio catalítico de la toxina de la difteria (DT) y tres regiones de unión a anticuerpo de la proteína G. DT3C se une específicamente a un resto Fc de un anticuerpo, es estable e induce la muerte celular inhibiendo la síntesis de proteínas cuando se capta en células. Mediante el uso de este sistema, se puede observar el efecto de internalización de un anticuerpo y su efecto citocida mediante la inmunotoxina al mismo tiempo (Yamaguchi, M., Hamada, H., y col., Biochemical and Biophysical Research Communications 454 (2014) 600-603).

#### 4-2 Evaluación de la actividad de internalización y la actividad como inmunotoxina utilizando DT3C

4 µg/ml de DT3C se añadieron a 25 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos, además, los sobrenadantes del cultivo de 11 hibridomas obtenidos mediante el método del Ejemplo 1 o un método equivalente al anterior se añadieron cada uno a 25 µl/pocillo a la placa, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se confirmó por adelantado que los antígenos reconocidos por los anticuerpos producidos por los hibridomas diferentes del hibridoma productor de TINA1 eran CD9, CD46, CD55, CD59, CD71, CD73, CD147, CD276, EpCAM, o EGFR.  $2 \times 10^4$  células/ml (medio RPMI1640 suplementado con FBS con un bajo contenido de IgG al 20 %) de células NCI-H322 se sembraron en el anterior a 50 µl/pocillo. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se cultivaron las células durante 3 días en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> a 37 °C. Tras el cultivo, se retiró el sobrenadante, y se añadieron WST al 10 %-FBS-RPMI1640 al 10 % a 100 µl/pocillo a la placa. Tras incubación durante 1 hora en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> a 37 °C, se midió el número de células vivas utilizando un lector de microplacas (DO<sub>450</sub> a DO<sub>640</sub>, infinite 200, Tecan Trading AG). Entre los sobrenadantes del cultivo de las células de hibridoma evaluadas, Los anticuerpos contra CD59, CD71, EGFR, EpCAM, o TROP2 se confirmó que tenían una fuerte actividad de internalización y una actividad como inmunotoxina (Figura 10).

#### 4-3) Diferencia en la actividad de internalización y actividad como inmunotoxina entre anticuerpos contra CD59, CD71, EGFR, EpCAM, o TROP2

Cada solución diluida de DT3C (0, 0,004, 0,04, 0,4, 4, o 40 µg/ml) se añadió a 25 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos, a continuación se añadió cada anticuerpo (40 µg/ml) a 25 µl/pocillo a la placa, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Además,  $2 \times 10^4$  células/ml (medio RPMI1640 suplementado con FBS con un bajo contenido de IgG al 20 %) de células NCI-H322 se sembraron en el anterior a 50 µl/pocillo. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se cultivaron las células durante 3 días en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> a 37 °C. Tras el cultivo, se eliminó el sobrenadante y se añadió WST al 10 % FBS-RPMI1640 al 1-10 % a 100 µl/pocillo a la placa. Tras incubación durante 1 hora en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> a 37 °C, se midió el número de células vivas utilizando un lector de placas (DO<sub>450</sub> a DO<sub>640</sub>). Entre los anticuerpos evaluados, TINA1, un anticuerpo contra TROP2, tuvo la actividad de internalización más fuerte y actividad como inmunotoxina

(Figura 11).

4-4) Diferencia en la actividad de internalización y actividad como inmunotoxina entre clones del anticuerpo anti-TROP2

5 Los anticuerpos TINA1 dirigidos contra TROP2 (inmunógeno: una línea NCI-H322 de cáncer de pulmón), KCL7A3 y KCL2D6 (inmunógeno: una línea de células KCL-MOH1 de cáncer de páncreas), Pr1E11 y Pr8H10 (inmunógeno: línea de células Pc-1 de cáncer de próstata), y NY16 y NY17 (inmunógeno: línea de células PK-1 de cáncer de páncreas) obtenida mediante el método del Ejemplo 1 o un método equivalente al anterior, y comercialmente disponible como 77220 (R&D Systems Inc.) se evaluaron para su actividad de internalización y actividad como inmunotoxina de la misma manera que en el Ejemplo 4-3). Como resultado, entre los 8 anticuerpos dirigidos contra TROP2, el anticuerpo TINA1 tuvo la actividad más fuerte (Figura 12).

**[Ejemplo 5: Determinación de la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable del gen del anticuerpo TINA1 y la producción del anticuerpo TINA1 quimérico (denominada en los sucesivos en el presente documento cTINA 1**

15 5-1) Determinación de la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable del gen del anticuerpo TINA1 5-1-1) Preparación del ARNm del hibridoma productor del anticuerpo TINA1

A fin de amplificar los ADNc que codifican las regiones variables del anticuerpo TINA1, se preparó ARNm a partir del hibridoma productor del anticuerpo TINA1 utilizando el kit de aislamiento del ARNm (Roche Applied Science).

5-1-2) Síntesis del ADNc (ADNc 5'-RACE-Ready) se sintetizó el ADNc (ADNc 5'-RACE-Ready) utilizando el ARNm (100 ng) preparado en 5-1-1), y el Kit de amplificación del ADNc SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.).

20 5-1-3) Amplificación del ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 mediante la PCR de 5'-RACE y la determinación de la secuencia

25 UPM (Mezcla A de cebador universal: incluida en el Kit de amplificación del ADNc SMARTer RACE) y un oligonucleótido que tiene una secuencia de 5'-AGAGTTCCAGGTC AAGGTC ACTGGCTCAGG-3' (SEQ ID NO: 33: cebador mG2aVR2) se utilizaron como cebadores para amplificar el ADNc de la región variable del gen de la cadena pesada mediante la PCR. Se usó UPM incluida en el Kit de amplificación del ADNc SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.), y se diseñó mG2aVR2 a partir de la secuencia de una región constante de la cadena pesada de ratón (IgG2a) en una base de datos.

30 el ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo TINA 1 se amplificó mediante la PCR de 5'-RACE utilizando este conjunto de cebadores y el ADNc (ADNc 5'-RACE-Ready) sintetizado en el Ejemplo 5-1-2) como un molde. Se llevó a cabo esta PCR de acuerdo con el manual del Kit de amplificación del ADNc SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) en el programa de la PCR touchdown utilizando KOD-plus (Toyobo Co., Ltd.) como polimerasa.

35 El ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada amplificado mediante la PCR de 5'-RACE se purificó usando el Kit de purificación de la PCR MinElute (QIAGEN N.V.) y a continuación se clonó utilizando el Kit de clonación de la PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen Corp.). La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada clonado se analizó mediante secuenciación. Los cebadores de secuenciación utilizados fueron el cebador mG2aVR2 anteriormente descrito diseñado a partir de la secuencia de una región constante de la cadena pesada de ratón en una base de datos, y NUP (Cebador A universal anidado: incluido en el Kit de amplificación del ADNc SMARTer RACE).

40 Se llevó a cabo el análisis de secuenciación utilizando un aparato de análisis de la secuencia génica ("Analizador de ADN ABI PRISM 3700" o "Analizador Applied Biosystems 3730xl", Applied Biosystems, Inc.), y la reacción de secuenciación empleó Gene Amp 9700 (Applied Biosystems, Inc.).

45 La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 se muestra en la SEQ ID NO: 1 del Listado de Secuencias y la secuencia de aminoácidos codificada de este modo se muestra en la SEQ ID NO: 2.

5-1-4) Amplificación de la región variable de la cadena ligera que codifica el ADNc del anticuerpo TINA1 mediante la PCR de 5'-RACE, y la determinación de la secuencia

50 UPM (Mezcla A de cebador universal: incluida en el Kit de amplificación del ADNc SMARTer RACE) y un oligonucleótido que tiene una secuencia de 5'-AGTCCA ACTGTTCAGGACGCCATTTTGTGCG-3' (SEQ ID NO: 34: cebador mKVR2) se utilizaron como cebadores para amplificar el ADNc de la región variable del gen de la cadena ligera del anticuerpo TINA1 mediante la PCR. Se usó UPM incluida en el Kit de amplificación del ADNc SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) y mKVR2 diseñada a partir de la secuencia de una región constante de la cadena ligera de ratón en una base de datos.

El ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo TINA1 se amplificó mediante la PCR de 5'-

RACE utilizando este conjunto de cebadores y el ADNc (ADNc 5'-RACE-Ready) sintetizado en el Ejemplo 5-1-2) como un molde. Esta PCR se llevó a cabo de acuerdo con el manual del Kit de amplificación del ADNc SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) en el programa de la PCR touchdown utilizando KOD-plus-(Toyobo Co., Ltd.) como polimerasa.

- 5 El ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera amplificado mediante la PCR de 5'-RACE se purificó utilizando el Kit de purificación de la PCR MinElute (QIAGEN N.V.) y a continuación se clonó utilizando el Kit de Clonación de la PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen Corp.). La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera clonada se analizó mediante secuenciación.

- 10 Los cebadores de la secuenciación utilizados fueron el cebador mKVR2 anteriormente descrito diseñado a partir de la secuencia de una región constante de la cadena ligera de ratón en una base de datos, y NUP.

El análisis de la secuenciación y la reacción de secuenciación emplearon el aparato anteriormente descrito.

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo TINA1 se muestra en la SEQ ID NO: 3 del Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos codificada de este modo se muestra en la SEQ ID NO: 4.

- 15 5-2) Producción del anticuerpo cTINA1

5-2-1) Construcción del vector de expresión pCMA-LK de la cadena ligera del anticuerpo quimérico y el anticuerpo humanizado

- 20 Un fragmento de aproximadamente 5,4 kb obtenido digiriendo un plásmido pcDNA3.3-TOPO/lacZ (Invitrogen Corp.) con las enzimas de restricción XbaI y PmeI, y un fragmento de ADN que contenía una secuencia de ADN que codifica una señal de secreción de la cadena κ humana y una región constante de la cadena κ humana que se muestra en la SEQ ID NO: 5 se ligaron utilizando un kit de clonación de la PCR In-Fusion Advantage (Clontech Laboratories, Inc.) para producir pcDNA3.3/IK.

- 25 pcDNA3.3/IK se usó como un molde en la PCR utilizando un conjunto de cebadores descrito a continuación. El fragmento obtenido de aproximadamente 3,8 kb se fosforiló y a continuación se autoligó para construir un vector de expresión pCMA-LK de una cadena ligera de anticuerpo quimérico y humanizado que tiene una secuencia de señalización, un sitio de clonación, y el gen de la región constante de la cadena κ humana en la dirección 3' del promotor del CMV. Conjunto de cebadores

5'-tatacctgacgacctagctagagcttggc-3' (SEQ ID NO: 35: cebador 3.3-F1)

5'-gctatggcagggcctgcccccgacttg-3' (SEQ ID NO: 36: cebador 3.3-R1)

- 30 5-2-2) Construcción del vector de expresión pCMA- G1 de la cadena pesada tipo IgG1 del anticuerpo quimérico y el anticuerpo humanizado

- 35 Un fragmento de ADN de pCMA-LK que carece de la secuencia de ADN que codifica una señal de secreción de la región constante de la cadena κ humana mediante digestión con XbaI y PmeI, y un fragmento de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica los aminoácidos de una secuencia de señalización de una cadena pesada humana y una región constante de la IgG1 humana que se muestra en la SEQ ID NO: 6 se ligaron utilizando el kit de clonación de la PCR In-Fusion Advantage (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión pCMA-G1 IgG1 del anticuerpo quimérico y humanizado que tiene una secuencia de señalización, un sitio de clonación, y el gen de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana en la dirección 3' del promotor del CMV.

5-2-3) Construcción del vector de expresión de la cadena pesada del anticuerpo cTINA1

- 40 Un fragmento de ADN que contiene el ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 se amplificó utilizando el ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada obtenido en el Ejemplo 5-1-3) como un molde, KOD-Plus-(Toyobo Co., Ltd.), y un conjunto de cebadores descrito a continuación, y se insertó en un sitio escindido por la enzima de restricción BspI del vector de expresión pCMA-G1 de la cadena pesada de tipo IgG1 del anticuerpo quimérico y humanizado utilizando el kit de clonación de la PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión de la cadena pesada del anticuerpo cTINA1. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G1/cTINA1". La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo cTINA1 se muestra en la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos codificada de este modo se muestra en la SEQ ID NO: 8. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 se describen también en la Figura 1.

- 50 Conjunto de cebadores para la cadena pesada del anticuerpo cTINA1

5'-CCAGATGGGTGCTGAGCCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAG-3' (SEQ ID NO: 37: cebador TINA1H-F)

5'-CTTGGTGGAGGCTGAGCTGACGGTGACCGGGTCCCTGCGCCCCAGAC-3' (SEQ ID NO: 38: cebador TINA1H-R)

- 55 5-2-4) Construcción del vector de expresión de la cadena ligera del anticuerpo cTINA1

Un fragmento de ADN que contiene el ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo TINA1 se amplificó utilizando el ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera obtenido en el Ejemplo 5-1-4) como un molde, KOD-Plus-(Toyobo Co., Ltd.), y un conjunto de cebadores descrito a continuación, y se insertó en un sitio escindido por la enzima de restricción BsiWI del vector de expresión pCMA-LK de la cadena ligera del anticuerpo quimérico y humanizado utilizando el kit de clonación de la PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión de la cadena ligera del anticuerpo cTINA1. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-LK/cTINA1". La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo cTINA1 se muestra en la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos codificada de este modo se muestra en la SEQ ID NO: 10. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 se describen también en la Figura 2.

Conjunto de cebadores para la cadena ligera del anticuerpo cTINA1

5'-ATCTCCGGCGCGTACGGCGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTC-3' (SEQ ID NO: 39: cebador TINA1L-F)

5'-GGAGGGGGCGGCCACAGCCCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCCAGC-3' (SEQ ID NO: 40: cebador TINA1L-R)

5-2-5) Producción a pequeña escala del anticuerpo cTINA1

Se subcultivaron células 293F FreeStyle (Invitrogen Corp.) y se cultivaron de acuerdo con el manual.

1 x 10<sup>7</sup> células 293F FreeStyle (Invitrogen Corp.) en la fase de crecimiento logarítmico se diluyeron con un medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.) hasta 9,6 ml, a continuación se sembraron en un frasco de almacenamiento cuadrado de 30 ml (Nalgene/Thermo Fisher Scientific, Inc.), y a continuación se cultivaron con agitación a 90 rpm durante 1 hora en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> al 8 % a 37 °C. Se disolvió polietilenimina (Polyscience n.º 24765; 30 µg) en Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 200 µl). Después, el vector de expresión de la cadena ligera (6 µg) y el vector de expresión de la cadena pesada (4 µg) preparados utilizando el kit PureLink HiPure Plasmid (Invitrogen Corp.) se añadieron a Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 200 µl). La solución mixta del vector de expresión/Opti-Pro SFM (200 µl) se añadió a la solución mixta de polietilenimina/Opti-Pro SFM (200 µl), y la mezcla se agitó suavemente, se dejó además durante 5 minutos, y a continuación se añadió a las células 293F FreeStyle. Un sobrenadante del cultivo obtenido mediante cultivo en agitación a 90 rpm durante 7 días en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> al 8 % a 37 °C se filtró a través de un filtro Minisart-Plus (Sartorius AG) y se utilizaron como una muestra para la evaluación.

El anticuerpo TINA1 quimérico humano obtenido mediante la combinación de pCMA-G1/cTINA1 y pCMA-LK/cTINA1 se designó como un anticuerpo "cTINA1".

### [Ejemplo 6: Diseño de anticuerpo humanizado de anticuerpo monoclonal de ratón anti-TROP2]

6-1) Diseño de la versión humanizada de TINA1

6-1-1) Modelización molecular de la región variable de TINA1

Se llevó a cabo la modelización molecular de las regiones variables de TINA1 mediante un método conocido en la técnica como modelización de la homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153 (1991)). Las regiones variables de TINA1 determinadas anteriormente se compararon con las secuencias primarias (están disponibles estructuras tridimensionales derivadas de estructuras cristalinas de rayos X) de regiones variables de inmunoglobulinas humanas registradas en el Protein Data Bank (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)). Como resultado, se seleccionó 1ZEA como una que tenía la homología de secuencias más elevada con la región variable de la cadena pesada de TINA1 entre los anticuerpos que tienen de forma similar un deleción en sus marcos. Asimismo, se seleccionó 3IU4 como una que tenía la homología de secuencias más elevada con la región variable de la cadena ligera de TINA1. Se prepararon las estructuras tridimensionales de las regiones marco como un "modelo de marco" combinando las coordenadas de 1ZEA y 3IU4 que correspondían a la cadena pesada y la cadena ligera de TINA1. Posteriormente, se incorporó la conformación típica de cada CDR en el modelo de marco.

Por último, Se llevó a cabo el cálculo de la energía para excluir el contacto interatómico poco ventajoso a fin de obtener posibles modelos moleculares de las regiones variables de TINA1 en términos de energía. Se llevaron a cabo estos procedimientos utilizando un programa de predicción de la estructura tridimensional de la proteína comercialmente disponible, Discovery Studio (Accelrys, Inc.).

6-1-2) Diseño de la secuencia de aminoácidos para TINA1 humanizado

Se construyó el anticuerpo TINA 1 humanizado mediante un método conocido en la técnica como injerto de la CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Se seleccionó un anticuerpo aceptor sobre la base de la homología de aminoácidos en las regiones marco. Las secuencias de las regiones marco de TINA1 se compararon con las secuencias de todos los marcos humanos registrados en la base de datos de Kabat (Nuc. Acid Res., 29, 205-206 (2001)) de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Como resultado, se seleccionó un anticuerpo HuPR1A3 como un aceptor debido a su homología de secuencias del 74 % como para las regiones marco. Los restos de aminoácidos de las regiones marco en HuPR1A3 se alinearon con los restos de aminoácidos de las regiones marco de TINA1 para identificar las posiciones de los aminoácidos que no se corresponden entre ellos. Las

posiciones de estos restos se analizaron utilizando el modelo tridimensional de TINA1 construido anteriormente. Después, se seleccionaron los restos donantes que se iban a injertar sobre el receptor de acuerdo con los criterios proporcionados por Queen y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Algunos restos donantes seleccionados de esta manera se transfirieron al anticuerpo aceptor para construir la secuencia TINA1 humanizada como se describe en los Ejemplos siguientes.

#### 6-2) Humanización de la cadena pesada de TINA1

##### 6-2-1) cadena pesada de tipo hTINA1-H1:

Una cadena pesada de TINA1 humanizada diseñada implicando la sustitución del aminoácido de la posición 21 (isoleucina) con valina, el aminoácido de la posición 28 (prolina) con alanina, el aminoácido de la posición 30 (leucina) con valina, el aminoácido de la posición 35 (ácido glutámico) con alanina, el aminoácido de la posición 36 (treonina) con serina, el aminoácido de la posición 38 (arginina) con lisina, el aminoácido de la posición 39 (isoleucina) con valina, el aminoácido de la posición 57 (glutamina) con arginina, el aminoácido de la posición 58 (lisina) con glutamina, el aminoácido de la posición 59 (metionina) con alanina, el aminoácido de la posición 62 (lisina) con glutamina, el aminoácido de la posición 65 (lisina) con ácido glutámico, el aminoácido de la posición 67 (isoleucina) con metionina, el aminoácido de la posición 87 (fenilalanina) con valina, el aminoácido de la posición 88 (alanina) con treonina, el aminoácido de la posición 89 (fenilalanina) con isoleucina, el aminoácido de la posición 91 (leucina) con alanina, el aminoácido de la posición 92 (ácido glutámico) con ácido aspártico, el aminoácido de la posición 95 (alanina) con treonina, el aminoácido de la posición 102 (isoleucina) con leucina, el aminoácido de la posición 104 (asparagina) con serina, el aminoácido de la posición 107 (asparagina) con serina, el aminoácido de la posición 111 (treonina) con alanina, el aminoácido de la posición 112 (treonina) con valina, el aminoácido de la posición 114 (fenilalanina) con tirosina, el aminoácido de la posición 132 (alanina) con glutamina, y el aminoácido en la posición 135 (alanina) con leucina ya que la cadena pesada de TINA1 que se muestra en la SEQ ID NO: 8 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena pesada de tipo hTINA1-H1".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hTINA1-H1 se describe en la SEQ ID NO: 12 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 19, una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 140 y una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 141 a 470 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 corresponde a la secuencia de señalización, la región variable de la cadena pesada, y la región constante de la cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 se describe en la SEQ ID NO: 11 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste en los nucleótidos 1 a 57, una secuencia que consiste en los nucleótidos 58 a 420, y una secuencia que consiste en los nucleótidos 421 a 1410 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 codifica la secuencia de señalización, la secuencia de la región variable de la cadena pesada, y la secuencia de la región constante de la cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 se describen también en la Figura 3.

##### 6-2-2) cadena pesada de tipo hTINA1-H2:

Una cadena pesada de TINA1 humanizada diseñada implicando la sustitución del aminoácido de la posición 21 (isoleucina) con valina, el aminoácido de la posición 28 (prolina) con alanina, el aminoácido de la posición 30 (leucina) con valina, el aminoácido de la posición 35 (ácido glutámico) con alanina, el aminoácido de la posición 36 (treonina) con serina, el aminoácido de la posición 38 (arginina) con lisina, el aminoácido de la posición 39 (isoleucina) con valina, el aminoácido de la posición 57 (glutamina) con arginina, el aminoácido de la posición 58 (lisina) con glutamina, el aminoácido de la posición 59 (metionina) con alanina, el aminoácido de la posición 62 (lisina) con glutamina, el aminoácido de la posición 65 (lisina) con ácido glutámico, el aminoácido de la posición 67 (isoleucina) con metionina, el aminoácido de la posición 87 (fenilalanina) con valina, el aminoácido de la posición 88 (alanina) con treonina, el aminoácido de la posición 89 (fenilalanina) con isoleucina, el aminoácido de la posición 92 (ácido glutámico) con ácido aspártico, el aminoácido de la posición 95 (alanina) con treonina, el aminoácido de la posición 102 (isoleucina) con leucina, el aminoácido de la posición 104 (asparagina) con serina, el aminoácido de la posición 107 (asparagina) con serina, el aminoácido de la posición 111 (treonina) con alanina, el aminoácido de la posición 112 (treonina) con valina, el aminoácido de la posición 114 (fenilalanina) con tirosina, el aminoácido de la posición 132 (alanina) con glutamina, y el aminoácido en la posición 135 (alanina) con leucina ya que la cadena pesada de TINA1 que se muestra en la SEQ ID NO: 8 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena pesada de tipo hTINA1-H2".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hTINA1-H2 se describe en la SEQ ID NO: 14 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 19, una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 140 y una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 141 a 470 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 corresponde a la secuencia de señalización, la región variable de la cadena pesada, y la región constante de la cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 se describe en la SEQ ID NO: 13 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste en los nucleótidos 1 a 57, una secuencia que consiste en los nucleótidos 58 a 420, y una secuencia que consiste en los nucleótidos 421 a 1410 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13 codifica la secuencia de señalización, la secuencia de la región variable de la cadena pesada, y la secuencia

de la región constante de la cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 se describen también en la Figura 4.

#### 6-2-3) cadena pesada de tipo hTINA1-H3:

5 Una cadena pesada de TINA1 humanizada diseñada implicando la sustitución del aminoácido de la posición 28 (prolina) con alanina, el aminoácido de la posición 30 (leucina) con valina, el aminoácido de la posición 36 (treonina) con serina, el aminoácido de la posición 38 (arginina) con lisina, el aminoácido de la posición 39 (isoleucina) con valina, el aminoácido de la posición 58 (lisina) con glutamina, el aminoácido de la posición 65 (lisina) con ácido glutámico, el aminoácido de la posición 67 (isoleucina) con metionina, el aminoácido de la posición 87 (fenilalanina) con valina, el aminoácido de la posición 88 (alanina) con treonina, el aminoácido de la posición 92 (ácido glutámico) 10 con ácido aspártico, el aminoácido de la posición 95 (alanina) con treonina, el aminoácido de la posición 102 (isoleucina) con leucina, el aminoácido de la posición 104 (asparagina) con serina, el aminoácido de la posición 107 (asparagina) con serina, el aminoácido de la posición 111 (treonina) con alanina, el aminoácido de la posición 112 (treonina) con valina, el aminoácido de la posición 114 (fenilalanina) con tirosina, el aminoácido de la posición 132 (alanina) con glutamina, y el aminoácido en la posición 135 (alanina) con leucina ya que la cadena pesada de TINA1 15 que se muestra en la SEQ ID NO: 8 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena pesada de tipo hTINA1-H3".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hTINA1-H3 se describe en la SEQ ID NO: 16 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 19, una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 140 y una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 141 a 470 en la 20 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 corresponde a la secuencia de señalización, la región variable de la cadena pesada, y la región constante de la cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 se describe en la SEQ ID NO: 15 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste en los nucleótidos 1 a 57, una secuencia que consiste en los nucleótidos 58 a 420, y una secuencia que consiste en los nucleótidos 421 a 1410 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID 25 NO: 15 codifica la secuencia de señalización, la secuencia de la región variable de la cadena pesada, y la secuencia de la región constante de la cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 se describen también en la Figura 5.

#### 6-3) Humanización de la cadena ligera de TINA1

##### 6-3-1) cadena ligera de tipo hTINA1-L1:

30 Una cadena ligera de TINA1 humanizada diseñada implicando la sustitución del aminoácido de la posición 23 (valina) con glutamina, el aminoácido de la posición 28 (histidina) con prolina, el aminoácido de la posición 29 (lisina) con serina, el aminoácido de la posición 30 (fenilalanina) con serina, el aminoácido de la posición 31 (metionina) con leucina, el aminoácido de la posición 33 (treonina) con alanina, el aminoácido de la posición 40 (serina) con treonina, 35 el aminoácido de la posición 62 (glutamina) con lisina, el aminoácido de la posición 63 (serina) con alanina, el aminoácido de la posición 80 (ácido aspártico) con serina, el aminoácido de la posición 83 (treonina) con serina, el aminoácido de la posición 90 (alanina) con ácido aspártico, el aminoácido de la posición 93 (fenilalanina) con leucina, el aminoácido de la posición 98 (valina) con leucina, el aminoácido de la posición 100 (alanina) con prolina, el aminoácido de la posición 103 (leucina) con fenilalanina, el aminoácido de la posición 120 (alanina) con glutamina, 40 el aminoácido de la posición 126 (leucina) con isoleucina, y el aminoácido en la posición 129 (alanina) con treonina ya que la cadena pesada de TINA1 que se muestra en la SEQ ID NO: 10 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena ligera de tipo hTINA1-L1".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hTINA1-L1 se describe en la SEQ ID NO: 18 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 20, una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 129 y una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 130 a 234 en la 45 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 corresponde a la secuencia de señalización, la región variable de la cadena ligera, y la región constante de la cadena ligera, respectivamente. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 se describe en la SEQ ID NO: 17 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste en los nucleótidos 1 a 60, una secuencia que consiste en los nucleótidos 61 a 387, y una secuencia que consiste en los nucleótidos 388 a 702 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17 codifica la 50 secuencia de señalización, la secuencia de la región variable de la cadena ligera, y la secuencia de la región constante de la cadena ligera, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 se describen también en la Figura 6.

##### 6-3-2) cadena ligera de tipo hTINA1-L2:

55 Una cadena ligera de TINA1 humanizada diseñada implicando la sustitución del aminoácido de la posición 28 (histidina) con prolina, el aminoácido de la posición 29 (lisina) con serina, el aminoácido de la posición 30 (fenilalanina) con serina, el aminoácido de la posición 31 (metionina) con leucina, el aminoácido de la posición 33 (treonina) con alanina, el aminoácido de la posición 40 (serina) con treonina, el aminoácido de la posición 62 (glutamina) con lisina, el aminoácido de la posición 63 (serina) con alanina, el aminoácido de la posición 80 (ácido



aspártico) con serina, el aminoácido de la posición 83 (treonina) con serina, el aminoácido de la posición 90 (alanina) con ácido aspártico, el aminoácido de la posición 93 (fenilalanina) con leucina, el aminoácido de la posición 98 (valina) con leucina, el aminoácido de la posición 100 (alanina) con prolina, el aminoácido de la posición 103 (leucina) con fenilalanina, el aminoácido de la posición 120 (alanina) con glutamina, el aminoácido de la posición 126 (leucina) con isoleucina, y el aminoácido en la posición 129 (alanina) con treonina ya que la cadena pesada de TINA1 que se muestra en la SEQ ID NO: 10 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena ligera de tipo hTINA1-L2".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hTINA1-L2 se describe en la SEQ ID NO: 20 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 20, una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 129 y una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 130 a 234 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 corresponde a la secuencia de señalización, la región variable de la cadena ligera, y la región constante de la cadena ligera, respectivamente. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se describe en la SEQ ID NO: 19 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste en los nucleótidos 1 a 60, una secuencia que consiste en los nucleótidos 61 a 387, y una secuencia que consiste en los nucleótidos 388 a 702 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 19 codifica la secuencia de señalización, la secuencia de la región variable de la cadena ligera, y la secuencia de la región constante de la cadena ligera, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 19 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se describen también en la Figura 7.

6-3-3) cadena ligera de tipo hTINA1-L3:

Una cadena ligera de TINA1 humanizada diseñada implicando la sustitución del aminoácido de la posición 28 (histidina) con prolina, el aminoácido de la posición 29 (lisina) con serina, el aminoácido de la posición 30 (fenilalanina) con serina, el aminoácido de la posición 31 (metionina) con leucina, el aminoácido de la posición 33 (treonina) con alanina, el aminoácido de la posición 40 (serina) con treonina, el aminoácido de la posición 62 (glutamina) con lisina, el aminoácido de la posición 63 (serina) con glutamina, el aminoácido de la posición 80 (ácido aspártico) con serina, el aminoácido de la posición 83 (treonina) con serina, el aminoácido de la posición 90 (alanina) con ácido aspártico, el aminoácido de la posición 93 (fenilalanina) con leucina, el aminoácido de la posición 98 (valina) con leucina, el aminoácido de la posición 100 (alanina) con prolina, el aminoácido de la posición 103 (leucina) con fenilalanina, el aminoácido de la posición 120 (alanina) con glutamina, el aminoácido de la posición 126 (leucina) con isoleucina, y el aminoácido en la posición 129 (alanina) con treonina ya que la cadena pesada de TINA1 que se muestra en la SEQ ID NO: 10 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena ligera de tipo hTINA1-L3".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hTINA1-L3 se describe en la SEQ ID NO: 22 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 20, una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 129 y una secuencia que consiste en los restos de aminoácidos 130 a 234 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 corresponde a la secuencia de señalización, la región variable de la cadena ligera, y la región constante de la cadena ligera, respectivamente. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 se describe en la SEQ ID NO: 21 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste en los nucleótidos 1 a 60, una secuencia que consiste en los nucleótidos 61 a 387, y una secuencia que consiste en los nucleótidos 388 a 702 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 21 codifica la secuencia de señalización, la secuencia de la región variable de la cadena ligera, y la secuencia de la región constante de la cadena ligera, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 21 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 se describen también en la Figura 8.

### **[Ejemplo 7: Construcción del vector de expresión del anticuerpo hTINA1 y producción del anticuerpo]**

7-1) Construcción del vector de expresión de la cadena pesada de hTINA1

7-1-1) Construcción del vector de expresión hTINA1-H1

Se sintetizó un fragmento de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-H1 que se muestra en las posiciones de los nucleótidos 36 a 437 de la secuencia de nucleótidos de hTINA1-H1 representada por la SEQ ID NO: 11 del Listado de Secuencias (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). Se amplificó un fragmento de ADN que contiene la secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-H1 utilizando el fragmento de ADN sintetizado como un molde, KOD-Plus-(Toyobo Co., Ltd.), y un conjunto de cebadores descrito a continuación, y se insertó en un sitio escindido por la enzima de restricción BlnI del vector de expresión pCMA-G1 de la cadena pesada de tipo IgG1 del anticuerpo quimérico y humanizado utilizando el kit de clonación de la PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión hTINA1-H1. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G1/ hTINA1- H1".

Conjunto de cebadores

5'-agctcccagatgggtgctgagc-3' (SEQ ID NO: 41: cebador EG-Inf-F)

5'-gggcccttggtggaggctgagc-3' (SEQ ID NO: 42: cebador EG1-Inf-R)

7-1-2) construcción del vector de expresión hTINA1-H2

Se sintetizó un fragmento de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-H2 que se muestra en las posiciones de los nucleótidos 36 a 437 de la secuencia de nucleótidos de hTINA1-H2 representada por la SEQ ID NO: 13 del Listado de Secuencias (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). y se construyó un vector de expresión hTINA1-H2 de la misma manera que en el Ejemplo 7-1-1). El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G1/hTINA1- H2".

#### 7-1-3) construcción del vector de expresión hTINA1-H3

Se sintetizó un fragmento de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-H3 que se muestra en las posiciones de los nucleótidos 36 a 437 de la secuencia de nucleótidos de hTINA1-H3 representada por la SEQ ID NO: 15 del Listado de Secuencias (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). y se construyó un vector de expresión hTINA1-H3 de la misma manera que en el Ejemplo 7-1-1). El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G1/hTINA1- H3".

#### 7-2) Construcción del vector de expresión de la cadena ligera de hTINA1

##### 7-2-1) construcción del vector de expresión hTINA1-L1

Se sintetizó un fragmento de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-L1 que se muestra en las posiciones de los nucleótidos 38 a 402 de la secuencia de nucleótidos de hTINA1-L1 representada por la SEQ ID NO: 17 del Listado de Secuencias (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). Se amplificó un fragmento de ADN que contiene la secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-L1 utilizando el fragmento de ADN sintetizado como un molde, KOD-Plus-(Toyobo Co., Ltd.), y un conjunto de cebadores descrito a continuación, y se insertó en un sitio escindido por la enzima de restricción BsiWI del vector de expresión pCMA-LK de la cadena ligera del anticuerpo quimérico y humanizado utilizando el kit de clonación de la PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión hTINA1-L1. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-LK/ hTINA1- L1".

Conjunto de cebadores

5'-ctgtggatctccggcgctacggc-3' (SEQ ID NO: 43: cebador CM-LKF)

5'-ggagggggcgccaccgtacg-3' (SEQ ID NO: 44: cebador KCL-Inf-R)

##### 7-2-2) construcción del vector de expresión hTINA1-L2

Se sintetizó un fragmento de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-L2 que se muestra en las posiciones de los nucleótidos 38 a 402 de la secuencia de nucleótidos de hTINA1-L2 representada por la SEQ ID NO: 19 del Listado de Secuencias (GeneArt Artificial Gene Synthesis service) y se construyó un vector de expresión hTINA1-L2 de la misma manera que en el Ejemplo 7-2-1). El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-LK/ hTINA1- L2".

##### 7-2-3) construcción del vector de expresión hTINA1-L3

Se sintetizó un fragmento de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-L3 que se muestra en las posiciones de los nucleótidos 38 a 402 de la secuencia de nucleótidos de hTINA1-L3 representada por la SEQ ID NO: 21 del Listado de Secuencias (GeneArt Artificial Gene Synthesis service) y se construyó un vector de expresión hTINA1-L3 de la misma manera que en el Ejemplo 7-2-1). El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-LK/ hTINA1- L3".

#### 7-3) Producción y purificación del anticuerpo hTINA1

##### 7-3-1) Producción a pequeña escala del anticuerpo hTINA1

Se produjo cada anticuerpo de la misma manera que en el Ejemplo 5-2-5).

El anticuerpo hTINA1 obtenido mediante la combinación de pCMA-G1/hTINA1-H 1 y pCMA-LK/hTINA1-L1 se designó como "hTINA1-H1L1"; El anticuerpo hTINA1 obtenido mediante la combinación de pCMA-G1/hTINA1-H2 y pCMA-LK/hTINA1-L1 se designó como "hTINA1-H2L1"; El anticuerpo hTINA1 obtenido mediante la combinación de pCMA-G1/hTINA1-H2 y pCMA-LK/hTINA1-L2 se designó como "hTINA1-H2L2"; y el anticuerpo hTINA1 obtenido mediante la combinación de pCMA-G1/hTINA1-H3 y pCMA-LK/hTINA1-L3 se designó como un anticuerpo "hTINA1-H3L3".

##### 7-3-2) Producción del anticuerpo hTINA1

hTINA1-H1L1, hTINA1-H2L1, hTINA1-H2L2, y hTINA1-H3L3 se produjeron mediante el siguiente método.

Se subcultivaron células 293F FreeStyle (Invitrogen Corp.) y se cultivaron de acuerdo con el manual.  $1.2 \times 10^9$  células 293F FreeStyle (Invitrogen Corp.) en la fase de crecimiento logarítmico se sembraron en un matraz Erlenmeyer Fernbach de 3 l (Corning Inc.), a continuación se diluyeron con un medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.) hasta  $1,0 \times 10^6$  células/ml, y a continuación se cultivaron con agitación a 90 rpm durante 1 hora en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> al 8 % a 37 °C. Se disolvió polietilenimina (Polyscience n.º 24765; 3,6 mg) en Opti-

Pro SFM (Invitrogen Corp.; 20 ml). Después, el vector de expresión de la cadena ligera (0,8 mg) y el vector de expresión de la cadena pesada (4 mg) preparados utilizando el kit PureLink HiPure Plasmid (Invitrogen Corp.) se añadieron a Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 20 ml). La solución mixta del vector de expresión/Opti-Pro SFM (20 ml) se añadió a la solución mixta de polietilimina/Opti-Pro SFM (20 ml), y la mezcla se agitó suavemente, se dejó además durante 5 minutos, y a continuación se añadió a las células 293F FreeStyle. Un sobrenadante del cultivo obtenido mediante cultivo en agitación a 90 rpm durante 7 días en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> al 8 % a 37 °C se filtró a través de un filtro de cápsulas desechable (AG) (ADVANTEC #CCS-045-E1H).

#### 7 -3-3) Purificación del anticuerpo hTINA1

Se purificó cada anticuerpo a partir del sobrenadante del cultivo obtenido anteriormente en 7-3-2) mediante dos etapas que utilizan la cromatografía de afinidad de la rProteína A (4 a 6 °C) e hidroxapatita cerámica (temperatura ambiente). Se llevaron a cabo las etapas de sustitución del tampón tras la purificación mediante la cromatografía de afinidad de la rProteína A y tras la purificación de la hidroxapatita cerámica de 4 a 6 °C. En primer lugar, se aplicó el sobrenadante del cultivo a MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Japan Corporation, columna HiTrap) equilibrado con PBS. Tras la entrada del sobrenadante del cultivo completo en la columna, se lavó la columna con PBS en una cantidad de al menos dos veces el volumen de la columna. A continuación, se recogieron las fracciones que contenían el anticuerpo mediante elución con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0). Se sustituyó el tampón de las fracciones con PBS mediante diálisis (Thermo Fisher Scientific, Inc., Casete de diálisis Slide-A-Lyzer) y a continuación se diluyó 5 veces con un tampón de fosfato de sodio 5 mM y MES 50 mM (pH 7,0). La solución de anticuerpo se aplicó a una columna de hidroxapatita cerámica (Bio-Rad Laboratories, Inc., Columna de hidroxapatita Bio-Scale CHT de Tipo-I) equilibrada con un tampón NaPi 5 mM, MES 50 mM, y NaCl 30 mM (pH 7,0). Se recogieron las fracciones que contenían anticuerpos mediante elución con un gradiente de concentración lineal utilizando cloruro de sodio. Se sustituyó el tampón de las fracciones con HBS o (histidina 25 mM/sorbitol al 5 %, pH 6,0) mediante diálisis (Thermo Fisher Scientific, Inc., Casete de diálisis Slide-A-Lyzer). Por último, se concentraron las fracciones y se ajustaron a una concentración de IgG de 20 mg/ml o más utilizando el dispositivo de filtro de UF de centrifuga VIVASPIN 20 (corte de pesos moleculares: UF10K, Sartorius AG, 4 °C), y se utilizaron como una muestra purificada.

[Ejemplo de referencia 1: Producción del vector de expresión del anticuerpo hRS7 y producción del anticuerpo]

Se produjo el anticuerpo hRS7 sobre la base de las secuencias de aminoácidos de una cadena ligera y una cadena pesada descritas en la publicación internacional n.º WO 2003/074566.

#### 1-1) Construcción del vector de expresión de la cadena pesada del anticuerpo hRS7

Se sintetizó un fragmento de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo hRS7 que se muestra en las posiciones de los nucleótidos 36 a 437 de la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo hRS7 representada por la SEQ ID NO: 29 del Listado de Secuencias (GeneArt Artificial Gene Synthesis service), y se construyó un vector de expresión de la cadena pesada del anticuerpo hRS7 de la misma manera que en el Ejemplo 7-1-1). El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G1/hRS7". La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo hRS7 se muestra en la SEQ ID NO: 30 del Listado de Secuencias.

#### 1-2) Construcción del vector de expresión de la cadena ligera del anticuerpo hRS7

Se sintetizó un fragmento de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo hRS7 que se muestra en las posiciones de los nucleótidos 38 a 402 de la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo hRS7 representada por la SEQ ID NO: 31 del Listado de Secuencias (GeneArt Artificial Gene Synthesis service) y se construyó un vector de expresión de la cadena ligera del anticuerpo hRS7 de la misma manera que en el Ejemplo 7-2-1). El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-LK/hRS7". La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo hRS7 se muestra en la SEQ ID NO: 32 del Listado de Secuencias.

#### 1-3) Producción y purificación del anticuerpo hRS7

##### 1-3-1) Producción del anticuerpo hRS7

El anticuerpo hRS7 se produjo de la misma manera que en el Ejemplo 7-3-2) mediante la combinación de pCMA-G1/hRS7 y pCMA-LK/hRS7.

##### 1-3-2) Purificación del anticuerpo hRS7

El anticuerpo se purificó a partir del sobrenadante del cultivo obtenido en 1-3-1) de la misma manera que en el Ejemplo 7-3-3).

#### [Ejemplo 8: Medición de la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo hTINA1 y el anticuerpo hRS7]

8-1 Medición de la afinidad de unión al antígeno utilizando el anticuerpo (sobrenadante del cultivo) producido a

pequeña escala

Se evaluó cada anticuerpo para su constante de disociación para un antígeno (Qimera de Fc de TROP2 humano recombinante) utilizando Biacore 3000 (GE Healthcare Japan Corporation) mediante el método de capturar el anticuerpo como un ligando sobre un anticuerpo inmovilizado (Fab) anti-IgG humana y evaluando el antígeno como un analito. Aproximadamente 2000 UR del anticuerpo (Fab) anti-IgG humana (kit de captura de Fab humano, GE Healthcare Japan Corporation) se unieron covalentemente a un chip detector CM5 (BIAcore, Inc.) mediante el método de acoplamiento de la amina. De manera similar, se inmovilizó el anticuerpo sobre una celda de flujo de referencia. El tampón de análisis utilizado fue HBS-EP+ (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %). Se añadió el sobrenadante del cultivo que contenía el anticuerpo durante 80 segundos sobre el chip inmovilizado con el anticuerpo (Fab) anti-IgG humana, y a continuación, Cada una de las diluciones en serie (1 a 1000 nM) del antígeno se añadió al anterior a un caudal de 30 µl/min durante 300 segundos. Posteriormente, Se controló la fase de disociación durante 600 segundos. Se añadió al anterior Gly-HCl 10 mM (pH 1,5) que contenía DMSO al 20 % como una solución regenerante a un caudal de 10 µl/min durante 60 segundos. Se analizaron los datos utilizando el modelo de unión bivalente de software analítico (software BIAevaluation, versión 4.1) para calcular una constante  $k_{on}$  de la velocidad de asociación, una constante  $k_{off}$  de la velocidad de disociación y una constante de disociación (KD;  $KD = k_{off}/k_{on}$ ).

[Tabla 1]

	Nombre	KD (M)
1	hTINA1-H1L1	6,3E-08
2	hTINA1-H2L1	6,9E-08
3	hTINA1-H2L2	7,1E-08
4	hTINA1-H3L3	5,8E-08
5	cTINA1	5,6E-08

Actividad de unión utilizando el sobrenadante del cultivo como muestra de anticuerpo

8-2) Medición de la afinidad de unión a antígeno utilizando anticuerpo purificado

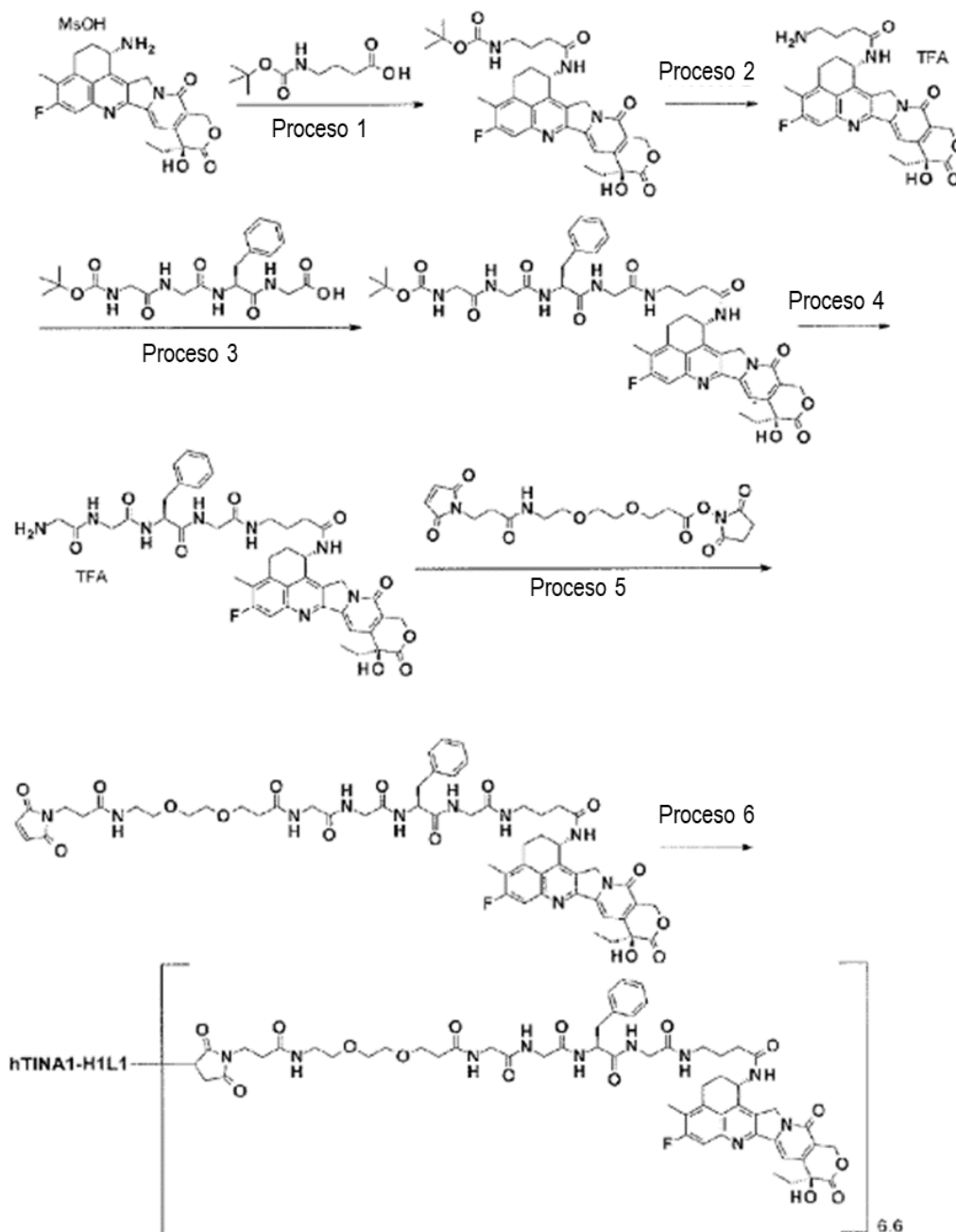
Se evaluó cada anticuerpo para su constante de disociación para un antígeno (Qimera de Fc de TROP2 humano recombinante) utilizando Biacore 3000 (GE Healthcare Japan Corporation) mediante el método de capturar el anticuerpo como un ligando sobre un anticuerpo inmovilizado (Fab) anti-IgG humana y evaluando el antígeno como un analito. Aproximadamente 2000 UR del anticuerpo (Fab) anti-IgG humana (kit de captura de Fab humano, GE Healthcare Japan Corporation) se unieron covalentemente a un chip detector CM5 (BIAcore, Inc.) mediante el método de acoplamiento de la amina. De manera similar, se inmovilizó el anticuerpo sobre una celda de flujo de referencia. El tampón de análisis utilizado fue HBS-EP+ (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %). Se añadió el anticuerpo durante 1 min sobre el chip inmovilizado con el anticuerpo (Fab) anti-IgG humana, y a continuación, Cada una de las diluciones en serie (1 a 1000 nM) del antígeno se añadió al anterior a un caudal de 30 µl/min durante 300 segundos. Posteriormente, Se controló la fase de disociación durante 600 segundos. Se añadió NaOH 25 mM diluido con un tampón de análisis dos veces al anterior como una solución regenerante a un caudal de 100 µl/min durante 3 segundos. Se analizaron los datos de la misma manera que anteriormente.

[Tabla 2]

	Nombre	KD (M)
1	hTINA1-H1L1	2,7E-08
2	hTINA1-H2L1	3,0E-08
3	hTINA1-H2L2	2,7E-08
4	hTINA1-H3L3	1,5E-08
5	hRS7	3,0E-10

Medición de la actividad de unión usando el anticuerpo purificado como muestra de anticuerpo [Ejemplo 9: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (1)]

[Fórmula 25]



Proceso 1: (4-[[[(1S,9S)-9-Etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino]-4-oxobutil]carbamato de *terc*-butilo

- 5 Ácido 4-(*terc*-Butoxicarbonilamino)butanoico (0,237 g, 1,13 mmol) se disolvió en diclorometano (10 ml). Se añadieron N-hidroxisuccinimida (0,130 g, 1,13 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,216 g, 1,13 mmol), y se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se añadió gota a gota a una solución de N,N-dimetilformamida (10 ml) cargado con mesilato de exatecano (0,500 g, 0,94 mmol) y trietilamina (0,157 ml, 1,13 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 1 día. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 8 : 2
- 10 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título (0,595 g, cuantitativo).  
 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,31 (9H, s), 1,58 (1H, t, J=7,2 Hz), 1,66 (2H, t, J=7,2 Hz), 1,89-1,82 (2H, m), 2,12-2,21 (3H, m), 2,39 (3H, s), 2,92 (2H, t, J=6,5 Hz), 3,17 (2H, s), 5,16 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,24 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,59-5,55 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,78 (1H, t, J=6,3 Hz), 7,30 (1H, s), 7,79 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,40 (1H, d, J=8,6 Hz).
- 15 EM (CLEM) m/z: 621 (M+H)<sup>+</sup>.

Proceso 2: Trifluoroacetato de 4-Amino-N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]butanoamida

El compuesto (0,388 g, 0,61 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior se disolvió en diclorometano (9 ml). Se añadieron ácido trifluoroacético (9 ml) y se agitó durante 4 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para proporcionar el compuesto del título (0,343 g, cuantitativo).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,79-1,92 (4H, m), 2,10-2,17 (2H, m), 2,27 (2H, t, J=7,0 Hz), 2,40 (3H, s), 2,80-2,86 (2H, m), 3,15-3,20 (2H, m), 5,15 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,26 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,54-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,32 (1H, s), 7,72 (3H, s a), 7,82 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,54 (1H, d, J=8,6 Hz).  
EM (CLEM) m/z: 521 (M+H)<sup>+</sup>.

Proceso 3: N-(*tert*-Butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino)-4-oxobutil)glicinamida

N-(*tert*-Butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanilglicina (0,081 g, 0,19 mmol) se disolvió en diclorometano (3 ml), se añadieron N-hidroxisuccinimida (0,021 g, 0,19 mol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,036 g, 0,19 mmol) y a continuación se agitó durante 3,5 horas. La solución de reacción se añadió gota a gota a una solución de N,N-dimetilformamida (1,5 ml) cargada con el compuesto (0,080 g, 0,15 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior, y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 8 : 2 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título (0,106 g, 73 %).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,36 (9H, s), 1,71 (2H, m), 1,86 (2H, t, J=7,8 Hz), 2,15-2,19 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,77 (1H, dd, J = 12,7, 8,8 Hz), 3,02 (1H, dd, J = 14,1, 4,7 Hz), 3,08-3,11 (2H, m), 3,16-3,19 (2H, m), 3,54 (2H, d, J=5,9 Hz), 3,57-3,77 (4H, m), 4,46-4,48 (1H, m), 5,16 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,55-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 7,00 (1H, t, J=6,3 Hz), 7,17-7,26 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,71 (1H, t, J=5,7 Hz), 7,80 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,92 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,15 (1H, d, J=8,2 Hz), 8,27 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,46 (1H, d, J=8,2 Hz).  
EM (CLEM) m/z: 939 (M+H)<sup>+</sup>.

Proceso 4: Trifluoroacetato de glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino)-4-oxobutil)glicinamida

El compuesto (1,97 g, 2,10 mmol) obtenido en el Proceso 3 anterior se disolvió en diclorometano (7 ml). Después de añadir el ácido trifluoroacético (7 ml), se agitó durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida, y se cargó con tolueno para destilación azeotrópica. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para proporcionar el compuesto del título (1,97 g, 99 %).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,71-1,73 (2H, m), 1,82-1,90 (2H, m), 2,12-2,20 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,75 (1H, dd, J = 13,7, 9,4 Hz), 3,03-3,09 (3H, m), 3,18-3,19 (2H, m), 3,58-3,60 (2H, m), 3,64 (1H, d, J=5,9 Hz), 3,69 (1H, d, J=5,9 Hz), 3,72 (1H, d, J=5,5 Hz), 3,87 (1H, dd, J = 16,8, 5,9 Hz), 4,50-4,56 (1H, m), 5,16 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,55-5,60 (1H, m), 7,17-7,27 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,78-7,81 (2H, m), 7,95-7,97 (3H, m), 8,33-8,35 (2H, m), 8,48-8,51 (2H, m).  
EM (CLEM) m/z: 839 (M+H)<sup>+</sup>.

Proceso 5: N-{3-[2-(2-[[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoil]amino)etoxi]etoxi]propanoil}glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino)-4-oxobutil)glicinamida

A una solución en N,N-dimetilformamida (1,20 ml) del compuesto (100 mg, 0,119 mmol) obtenido en el Proceso 4 anterior, se añadieron diisopropiletilamina (20,8 µl, 0,119 mmol) y 3-(2-(2-(3-maleinimidapropanamida)etoxi)etoxi)propanoato de N-succinimidilo (50,7 mg, 0,119 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 5 : 1 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (66,5 mg, 48 %).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,85 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,65-1,74 (2H, m), 1,77-1,90 (2H, m), 2,07-2,19 (4H, m), 2,30 (2H, t, J = 7,2 Hz), 2,33-2,36 (2H, m), 2,38 (3H, s), 2,76 (1H, dd, J = 13,7, 9,8 Hz), 2,96-3,18 (9H, m), 3,42-3,44 (4H, m), 3,53-3,76 (10H, m), 4,43 (1H, td, J = 8,6, 4,7 Hz), 5,14 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,23 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,38 (1H, d, J = 17,2 Hz), 5,42 (1H, d, J = 17,2 Hz), 5,52-5,58 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,98 (2H, s), 7,12-7,17 (1H, m), 7,18-7,25 (4H, m), 7,29 (1H, s), 7,69 (1H, t, J = 5,5 Hz), 7,78 (1H, d, J = 11,3 Hz), 7,98-8,03 (2H, m), 8,11 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,16 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,23 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,44 (1H, d, J = 9,0 Hz).  
EM (CLEM) m/z: 1149 (M+H)<sup>+</sup>.

Proceso 6: Conjugado fármaco-anticuerpo (1)

Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 se preparó para tener una concentración de

anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (usando como coeficiente de absorción a 280 nm, 1,54)) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (10,0 ml) se recogió en un tubo de 50 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 ml). Tras confirmar que la solución tenía pH  $7,4 \pm 0,1$ , el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

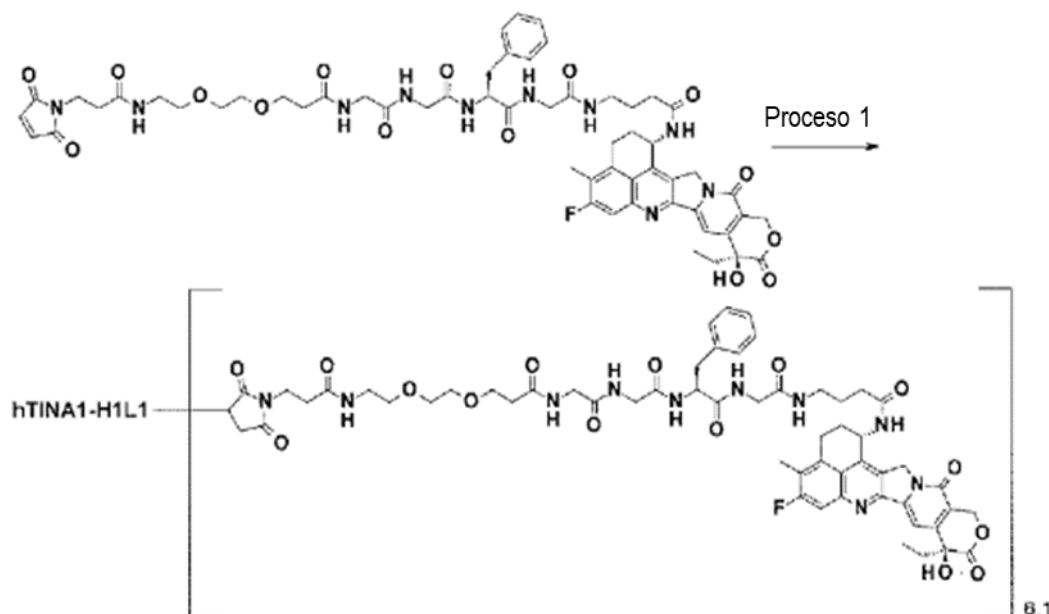
Conjugación entre el anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras incubar la solución anterior durante 10 minutos en un baño de agua a temperatura ambiente, se añadió a lo anterior una solución de dimetil sulfoxido (0,567 ml). Posteriormente, una solución de dimetil sulfoxido 10 mM que contenía el compuesto obtenido en el anterior Proceso 5 (0,635 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a lo anterior y se agitó usando un rotor de tubos (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,127 ml; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a lo anterior y se agitó para finalizar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos más.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1 para dar 35,0 ml de una solución que contiene el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento común E descrito en el Método de producción 1 se usaron  $\epsilon_{D,280} = 4964$  (valor promedio medido), y  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 2,70 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 94,5 mg (95 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común E: 6,6.

#### [Ejemplo 10: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (2)]

[Fórmula 26]



25 Proceso 1: Conjugado fármaco-anticuerpo (2)

Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (usando como coeficiente de absorción a 280 nm, 1,54)) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (2,00 ml) se recogió en un tubo de 4 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 ml; 5,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,100 ml). Tras confirmar que la solución tenía pH  $7,4 \pm 0,1$ , el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras incubar la solución anterior durante 10 minutos en un baño de agua a 15 °C, una solución de dimetil sulfoxido (0,127 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 5 del Ejemplo 9 se añadió a lo anterior y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 1 hora. A continuación, una

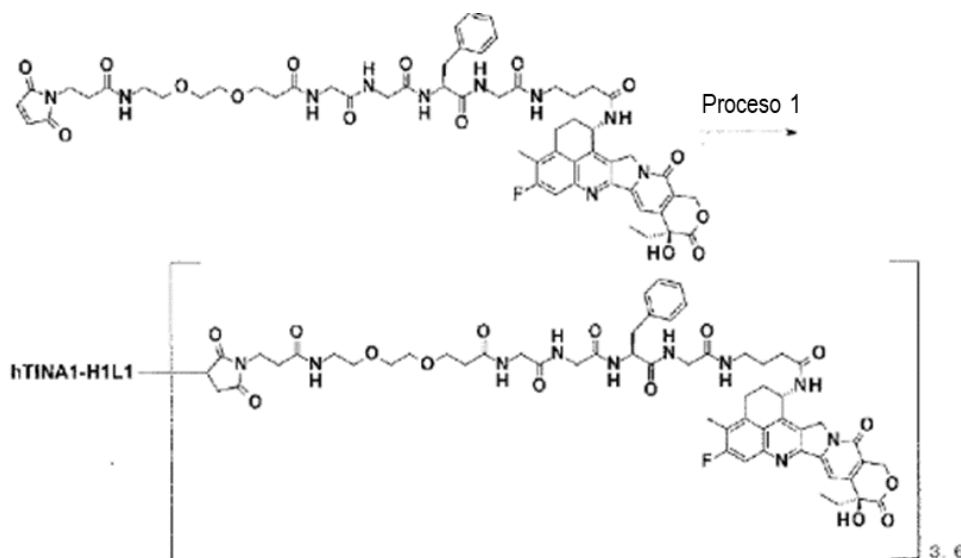
solución acuosa (0,0190 ml; 13,8 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a lo anterior y se agitó usando un rotor de tubos para finalizar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

- 5 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1 para dar 9,00 ml de una solución que contiene el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento común E descrito en el Método de producción 1 se usaron  $\epsilon_{D,280} = 4964$  (valor promedio medido), y  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (valor promedio medido), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

- 10 Concentración de anticuerpo: 2,08 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 18,7 mg (94 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común E: 6,1.

### [Ejemplo 11: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (3)]

[Fórmula 27]



Proceso 1: Conjugado fármaco-anticuerpo (3)

- 15 Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (usando como coeficiente de absorción a 280 nm, 1,54) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (5,0 ml) se recogió en un recipiente de 15 ml, se cargó con una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 ml) con agitación, y a continuación se agitó a 37 °C durante 10 minutos. Tras añadir la anterior
- 20 a una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0745 ml; 2,3 equivalentes por molécula de anticuerpo) con agitación y confirmación posterior de que la solución tenía un pH de  $7,0 \pm 0,1$ , el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante agitación a 37 °C durante 1 hora.

- 25 Conjugación entre el anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras agitar la solución anterior durante 10 minutos en un baño de agua a 15 °C, una solución de dimetil sulfóxido (0,162 ml; 5,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 5 del Ejemplo 9 se añadió gradualmente gota a gota y se agitó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0418 ml; 12,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a lo anterior y se agitó para finalizar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

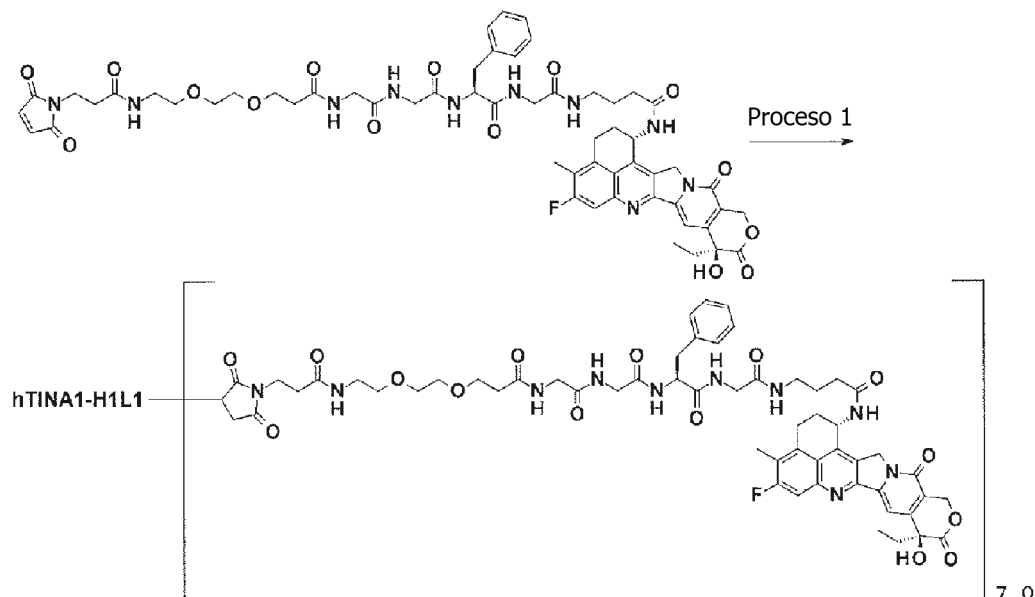
- 30 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1 para dar 21,0 ml de una solución que contiene el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos comunes E y F descritos en el Método de producción 1 se usaron  $\epsilon_{D,280} = 4964$  (valor promedio medido), y  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (valor promedio medido), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

- 35 Concentración de anticuerpo: 2,19 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 46,0 mg (92 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común E: 3,6, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común F: 3,6.



[Ejemplo 12: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (4)]

[Fórmula 28]



Proceso 1: Conjugado fármaco-anticuerpo (4)

- 5 Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10,0 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (usando como coeficiente de absorción a 280 nm, 1,54)) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (5,00 ml) se recogió en un recipiente de 15 ml, se cargó con una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 ml) con agitación, y a continuación se agitó a 37 °C durante 10 minutos. Tras añadir la
- 10 anterior a una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,162 ml; 5,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) con agitación y confirmación posterior de que la solución tenía un pH de  $7,0 \pm 0,1$ , el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante agitación a 37 °C durante 1 hora.

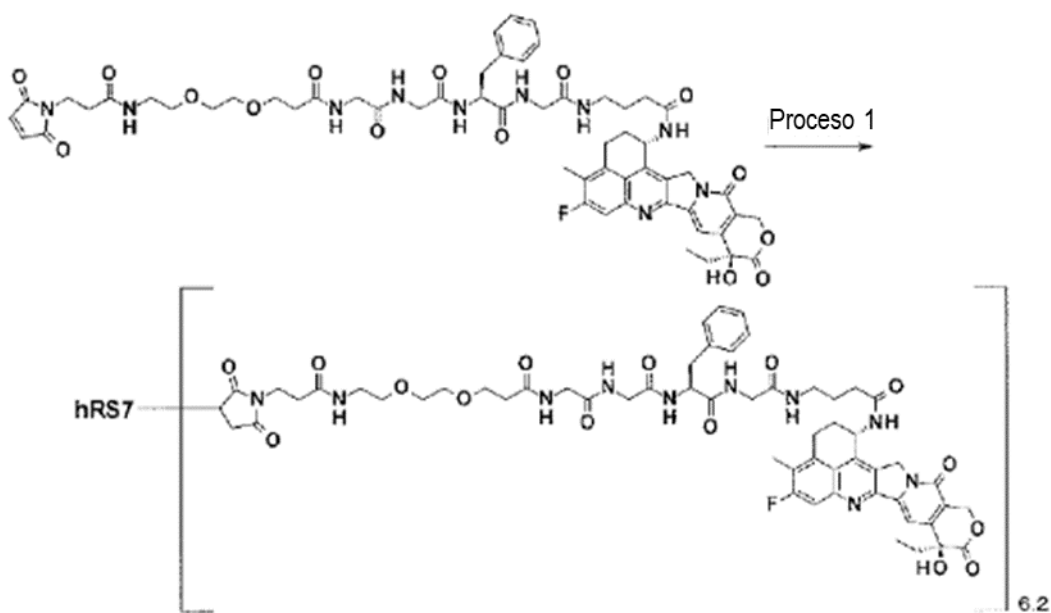
- 15 Conjugación entre el anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras agitar la solución anterior durante 10 minutos en un baño de agua a 15 °C, una solución de dimetil sulfoxido (0,389 ml; 12,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 5 del Ejemplo 9 se añadió gradualmente gota a gota y se agitó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0418 ml; 12,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a lo anterior y se agitó para finalizar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

- 20 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1 para dar 21,0 ml de una solución que contiene el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos comunes E y F descritos en el Método de producción 1 se usaron  $\epsilon_{D,280} = 4964$  (valor promedio medido), y  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

- 25 Concentración de anticuerpo: 2,19 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 46,0 mg (92 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común E: 7,0, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común F: 7,0.

[Ejemplo de referencia 13: Producción de hRS7 ADC (5)]

30 [Fórmula 29]



Proceso 1: Conjugado fármaco-anticuerpo (5)

5 Reducción del anticuerpo: El hRS7 producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (usando como coeficiente de absorción a 280 nm, 1,56)) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (2,0 ml) se recogió en un tubo de 4 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 ml; 5,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,100 ml). Tras confirmar que la solución tenía pH 7,4 ± 0,1, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

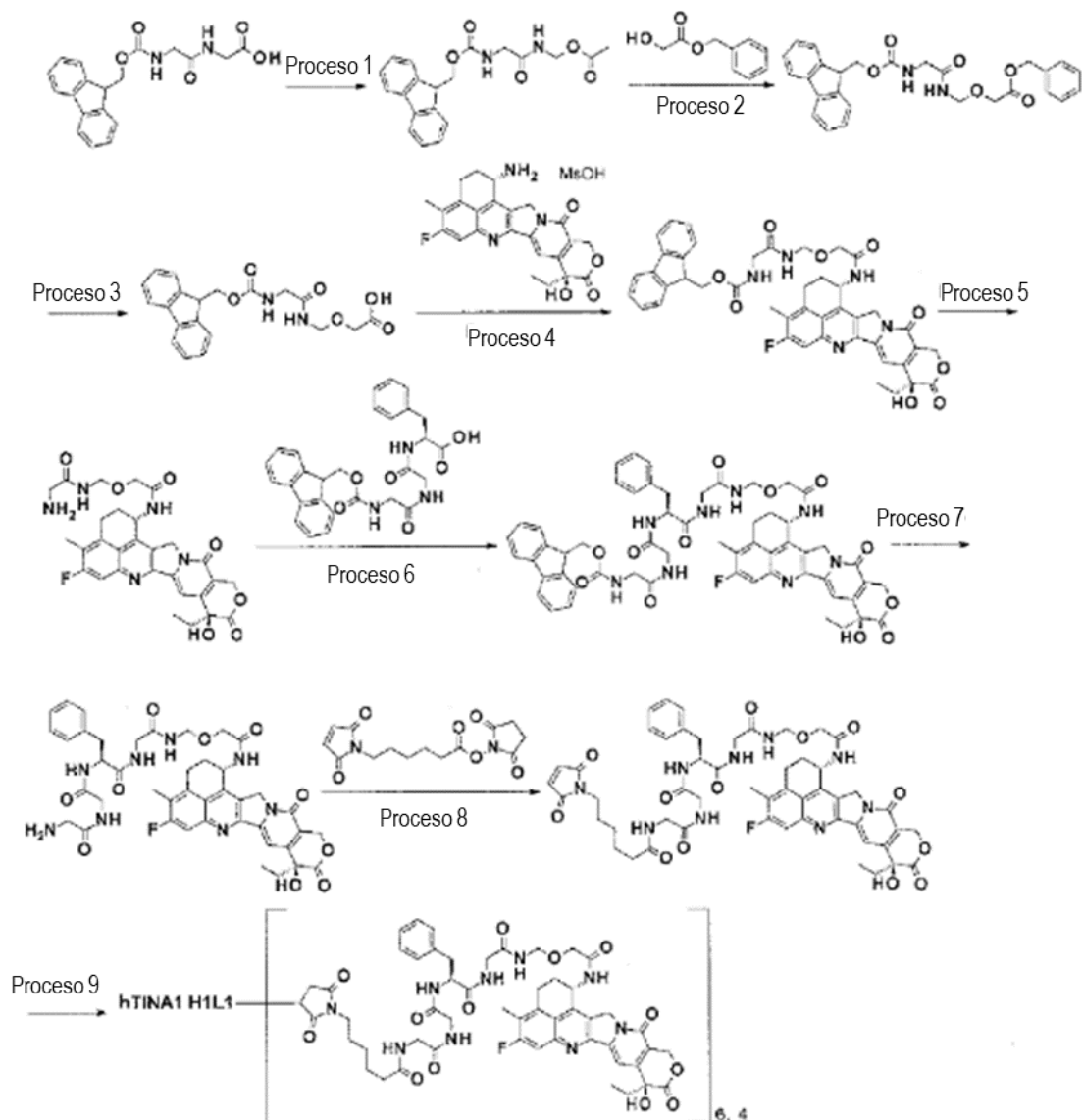
15 Conjugación entre el anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras incubar la solución anterior durante 10 minutos en un baño de agua a 15 °C, una solución de dimetil sulfoxido (0,127 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 5 del Ejemplo 9 se añadió a lo anterior y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0190 ml; 13,8 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a lo anterior y se agitó usando un rotor de tubos para finalizar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

20 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1 para dar 9,00 ml de una solución que contiene el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento común E descrito en el Método de producción 1 se usaron  $\epsilon_{D,280} = 4964$  (valor promedio medido), y  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (valor promedio medido), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 2,04 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 18,4 mg (92 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común E: 6,2.

25 [Ejemplo 14: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (6)]

[Fórmula 30]



Proceso 1: Acetato de ((N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil)amino)metilo

A una mezcla que contiene N-9-fluorenilmetoxycarbonilglicilglicina (4,33 g, 12,2 mmol), tetrahidrofurano (120 ml), y tolueno (40,0 ml), se añadieron piridina (1,16 ml, 14,7 mmol) y tetraacetato de plomo (6,84 g, 14,7 mmol) y se calentó a temperatura de reflujo durante 5 horas. Después de enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, las sustancias insolubles se eliminaron mediante filtración en Celite, y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua y solución saturada de salmuera, y a continuación la capa acuosa se secó con sulfato de magnesio anhidro. Una vez que el disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice [hexano : acetato de etilo = 9 : 1 (v/v) - acetato de etilo] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (3,00 g, 67 %).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2,07 (3H, s), 3,90 (2H, d, J=5,1 Hz), 4,23 (1H, t, J=7,0 Hz), 4,46 (2H, d, J=6,6 Hz), 5,26 (2H, d, J=7,0 Hz), 5,32 (1H, s a), 6,96 (1H, s a), 7,32 (2H, t, J=7,3 Hz), 7,41 (2H, t, J=7,3 Hz), 7,59 (2H, d, J=7,3 Hz), 7,77 (2H, d, J=7,3 Hz).

Proceso 2: [(N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil)amino]metoxi]acetato de bencilo

A una solución en tetrahidrofurano (40,0 ml) del compuesto (3,68 g, 10,0 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior y glicolato de bencilo (4,99 g, 30,0 mmol), se añadió *tert*-butóxido de potasio (2,24 g, 20,0 mmol) a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución de reacción se cargó con acetato de etilo y agua a 0 °C y se extrajo con acetato de etilo y cloroforno. La capa orgánica obtenida se secó con sulfato sódico y se filtró. El disolvente se retiró a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en dioxano (40,0 ml) y agua (10,0 ml), se cargó con hidrogenocarbonato de sodio (1,01 g, 12,0 mmol) y cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (2,59 g, 10,0 mmol),

y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se cargó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenido se secó con sulfato sódico y se filtró. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano : acetato de etilo = 100 : 0 (v/v) - 0 : 100] para proporcionar el compuesto del título en forma de una sustancia oleosa incolora (1,88 g, 40 %).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3,84 (2H, d, J=5,5 Hz), 4,24 (3H, t, J=6,5 Hz), 4,49 (2H, d, J=6,7 Hz), 4,88 (2H, d, J=6,7 Hz), 5,15-5,27 (1H, m), 5,19 (2H, s), 6,74 (1H, s a), 7,31-7,39 (7H, m), 7,43 (2H, t, J=7,4 Hz), 7,61 (2H, d, J=7,4 Hz), 7,79 (2H, d, J=7,4 Hz).

Proceso 3: Ácido [(N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil)amino]metoxiacético

El compuesto (1,88 g, 3,96 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior se disolvió en etanol (40,0 ml) y acetato de etilo (20,0 ml). Tras añadir catalizador de paladio sobre carbono (376 mg), se agitó bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 2 horas. Las sustancias insolubles se eliminaron mediante filtración con Celite, y el disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (1,52 g, cuantitativo).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 3,62 (2H, d, J=6,3 Hz), 3,97 (2H, s), 4,18-4,32 (3H, m), 4,60 (2H, d, J=6,7 Hz), 7,29-7,46 (4H, m), 7,58 (1H, t, J=5,9 Hz), 7,72 (2H, d, J=7,4 Hz), 7,90 (2H, d, J=7,4 Hz), 8,71 (1H, t, J=6,5 Hz).

Proceso 4: (2-[(2-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino]-2-oxoetoxi)metil]amino)-2-oxoetil]carbamato de 9H-Fluoren-9-ilmetilo

Con enfriamiento de hielo, a una solución de N,N-dimetilformamida (10,0 ml) de mesilato de exatecano (0,283 g, 0,533 mmol), N-hidroxisuccinimida (61,4 mg, 0,533 mmol), y el compuesto (0,205 g, 0,533 mmol) obtenido en el Proceso 3 anterior, Se añadieron N,N-diisopropiletilamina (92,9 µl, 0,533 mmol) y N,N'-diclohexilcarbodiimida (0,143 g, 0,693 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - capa orgánica repartida de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color marrón pálido (0,352 g, 82 %).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,81 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,73-1,87 (2H, m), 2,06-2,20 (2H, m), 2,34 (3H, s), 3,01-3,23 (2H, m), 3,58 (2H, d, J=6,7 Hz), 3,98 (2H, s), 4,13-4,25 (3H, m), 4,60 (2H, d, J=6,7 Hz), 5,09-5,22 (2H, m), 5,32-5,42 (2H, m), 5,50-5,59 (1H, m), 6,49 (1H, s), 7,24-7,30 (3H, m), 7,36 (2H, t, J=7,4 Hz), 7,53 (1H, t, J=6,3 Hz), 7,66 (2H, d, J=7,4 Hz), 7,75 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,84 (2H, d, J=7,4 Hz), 8,47 (1H, d, J=8,6 Hz), 8,77 (1H, t, J=6,7 Hz).

EM (IEN) m/z: 802 (M+H)<sup>+</sup>.

Proceso 5: N-[(2-[(1S,9S)-9-Etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H, 12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino]-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

A una solución en N,N-dimetilformamida (11,0 ml) del compuesto (0,881 g, 1,10 mmol) obtenido en el Proceso 4 anterior, se añadió piperidina (1,1 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un mezcla que contenía el compuesto del título. La mezcla se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Proceso 6: N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino]-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

Con enfriamiento de hielo, a una solución en N,N-dimetilformamida (50,0 ml) de la mezcla (0,439 mmol) obtenida en el Proceso 5 anterior, N-hidroxisuccinimida (0,101 g, 0,878 mmol), y N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanina (patente japonesa abierta a consulta N.º 2002-60351; 0,440 g, 0,878 mmol), se añadió N,N'-diclohexilcarbodiimida (0,181 g, 0,878 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 9 : 1 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color naranja pálido (0,269 g, 58 %).

EM (IEN) m/z: 1063 (M+H)<sup>+</sup>.

Proceso 7: Glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino]-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

A una solución en N,N-dimetilformamida (4,00 ml) del compuesto (0,269 g, 0,253 mmol) obtenido en el Proceso 6 anterior, se añadió piperidina (0,251 ml, 2,53 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un mezcla que contenía el compuesto del título. La mezcla se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Proceso 8: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino]-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

A una solución en N,N-dimetilformamida (10,0 ml) del compuesto (0,253 mmol) obtenido en el Proceso 7 anterior, se añadió hexanoato de N-succinimidil-6-maleimida (0,156 g, 0,506 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 9 : 1 (v/v)] para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,100 g, 38 %).

5 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,83 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,09-1,21 (2H, m), 1,33-1,47 (4H, m), 1,75-1,90 (2H, m), 2,00-2,23 (4H, m), 2,36 (3H, s), 2,69-2,81 (1H, m), 2,94-3,03 (1H, m), 3,06-3,22 (2H, m), 3,23-3,74 (8H, m), 3,98 (2H, s), 4,39-4,50 (1H, m), 4,60 (2H, d, J=6,7 Hz), 5,17 (2H, s), 5,39 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,50 (1H, s), 6,96 (2H, s), 7,11-7,24 (5H, m), 7,28 (1H, s), 7,75 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,97 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,09 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,27 (1H, t, J=6,5 Hz), 8,48 (1H, d, J=9,0 Hz), 8,60 (1H, t, J=6,5 Hz).  
10 EM (IEN) m/z: 1034 (M+H)<sup>+</sup>.

Proceso 9: Conjugado fármaco-anticuerpo (6)

Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (usando como coeficiente de absorción a 280 nm, 1,54) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (10,0 ml) se recogió en un tubo de 50 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 ml). Tras confirmar que la solución tenía pH 7,4 ± 0,1, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

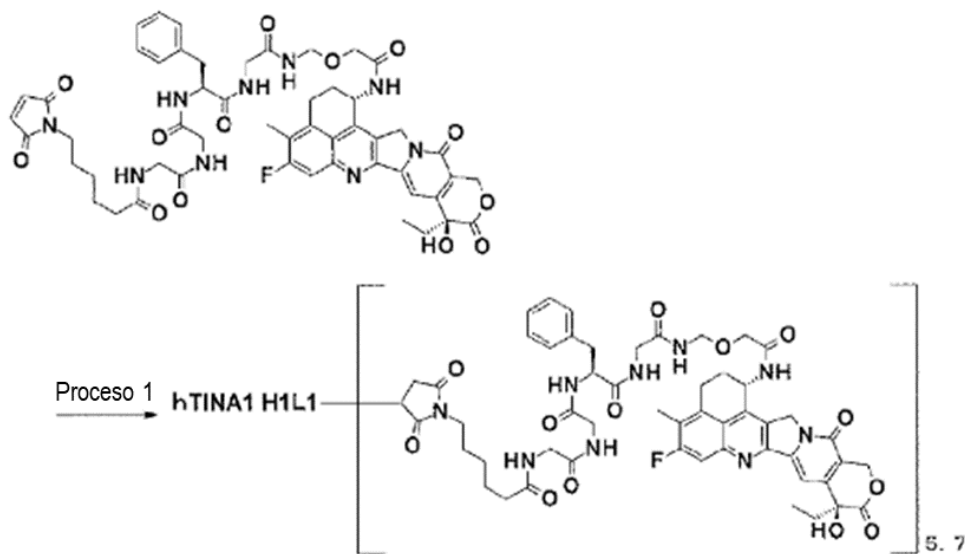
20 Conjugación entre el anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras incubar la solución anterior durante 10 minutos en un baño de agua a temperatura normal, se añadió a lo anterior una solución de dimetil sulfóxido (0,567 ml). Posteriormente, una solución de dimetil sulfóxido 10 mM que contenía el compuesto obtenido en el anterior Proceso 8 (0,635 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a lo anterior y se agitó usando un rotor de tubos para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A  
25 continuación, una solución acuosa (0,127 ml; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a lo anterior y se agitó para finalizar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos más.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1 para dar 35,0 ml de una solución que contiene el conjugado fármaco-anticuerpo del título.  
30 Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento común E descrito en el Método de producción 1 se usaron ε<sub>D,280</sub> = 5178 (valor promedio medido), y ε<sub>D,370</sub> = 20217 (valor promedio medido), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 2,70 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 94,5 mg (95 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común E: 6,4.

35 [Ejemplo 15: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (7)]

[Fórmula 31]



Proceso 1: Conjugado fármaco-anticuerpo (7)

Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (usando como coeficiente de absorción a 280 nm, 1,54)) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (2,0 ml) se recogió en un tubo de 4 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 ml; 5,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0299 ml). Tras confirmar que la solución tenía pH  $7,0 \pm 0,1$ , el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

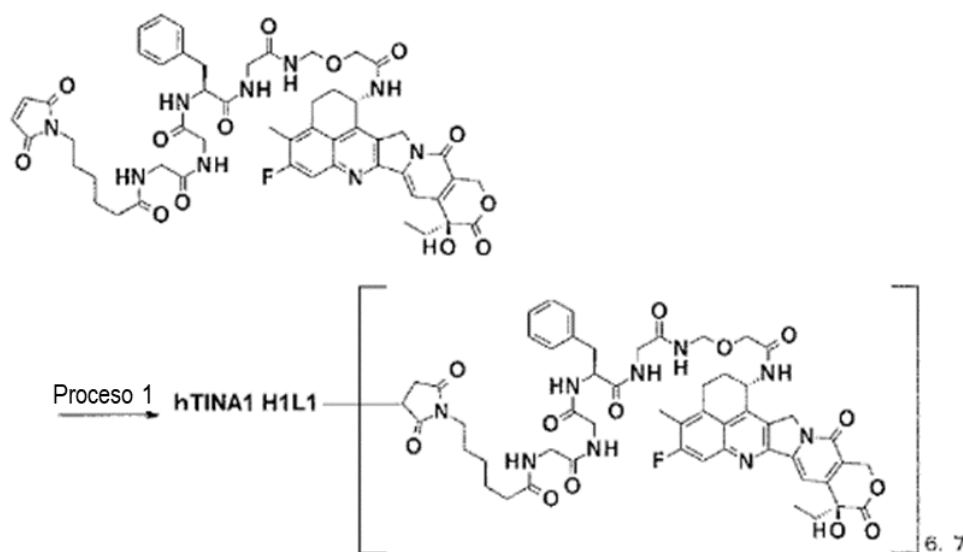
Conjugación entre el anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras incubar la solución anterior durante 10 minutos en un baño de agua a 15 °C, una solución de dimetil sulfóxido (0,127 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 8 del Ejemplo 14 se añadió a lo anterior y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0190 ml; 13.8 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a lo anterior y se agitó usando un rotor de tubos para finalizar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1 para dar 9,00 ml de una solución que contiene el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento común E descrito en el Método de producción 1 se usaron  $\epsilon_{D,280} = 5178$  (valor promedio medido), y  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (valor promedio medido)), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 2,04 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 18,4 mg (92 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común E: 5,7.

#### [Ejemplo 16: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (8)]

[Fórmula 32]



#### 25 Proceso 1: Conjugado fármaco-anticuerpo (8)

Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (usando como coeficiente de absorción a 280 nm, 1,54)) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (30,0 ml) se recogió en un recipiente de 100 ml, se cargó con una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,4875 ml) con agitación, y a continuación se agitó a 37 °C durante 10 minutos. Tras añadir la anterior a una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,9721 ml; 5,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) con agitación y confirmación posterior de que la solución tenía un pH de  $7,0 \pm 0,1$ , el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante agitación a 37 °C durante 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras agitar la solución anterior durante 10 minutos en un baño de agua a 15 °C, una solución de dimetil sulfóxido (2,33 ml; 12,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 8 del Ejemplo 14 se añadió gradualmente gota a gota y se agitó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,251 ml; 12,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a lo anterior y se agitó para finalizar la reacción del enlazador de fármaco a

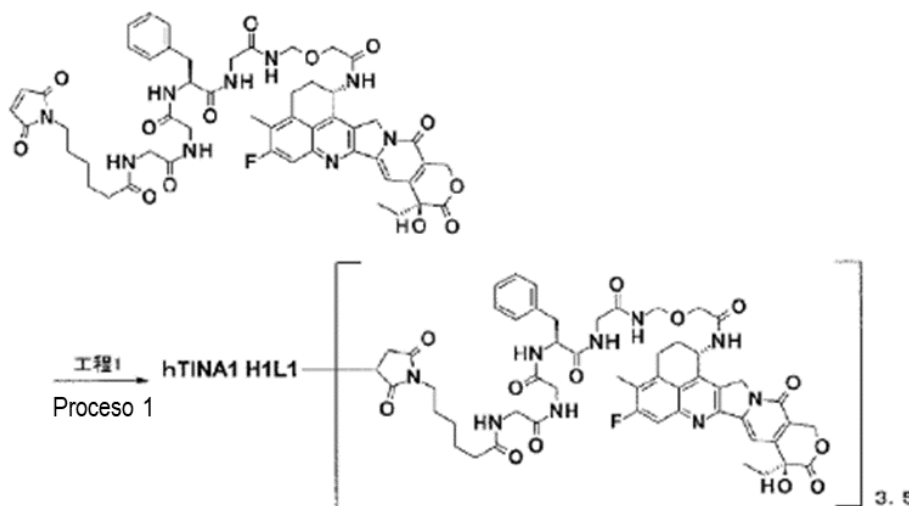
temperatura ambiente durante 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1 para dar 98,0 ml de una solución que contiene el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Después, la solución se concentró según el Procedimiento común A descrito en el Método de producción 1 para dar 17,5 ml de una solución que contenía el conjugado fármaco-anticuerpo del título.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos comunes E y F descritos en el Método de producción 1 se usaron  $\epsilon_{D,280} = 5178$  (valor promedio medido), y  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (valor promedio medido), se obtuvieron los siguientes valores característicos. Concentración de anticuerpo: 14,6 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 256 mg (85 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común E: 6,7, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común F: 7,0.

### [Ejemplo 17: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (9)]

[Fórmula 33]



#### 15 Proceso 1: Conjugado fármaco-anticuerpo (9)

Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (usando como coeficiente de absorción a 280 nm, 1,54)) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (5,0 ml) se recogió en un recipiente de 15 ml, se cargó con una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 ml) con agitación, y a continuación se agitó a 37 °C durante 10 minutos. Tras añadir la anterior a una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0778 ml; 2,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) con agitación y confirmación posterior de que la solución tenía un pH de 7,0 ± 0,1, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante agitación a 37 °C durante 1 hora.

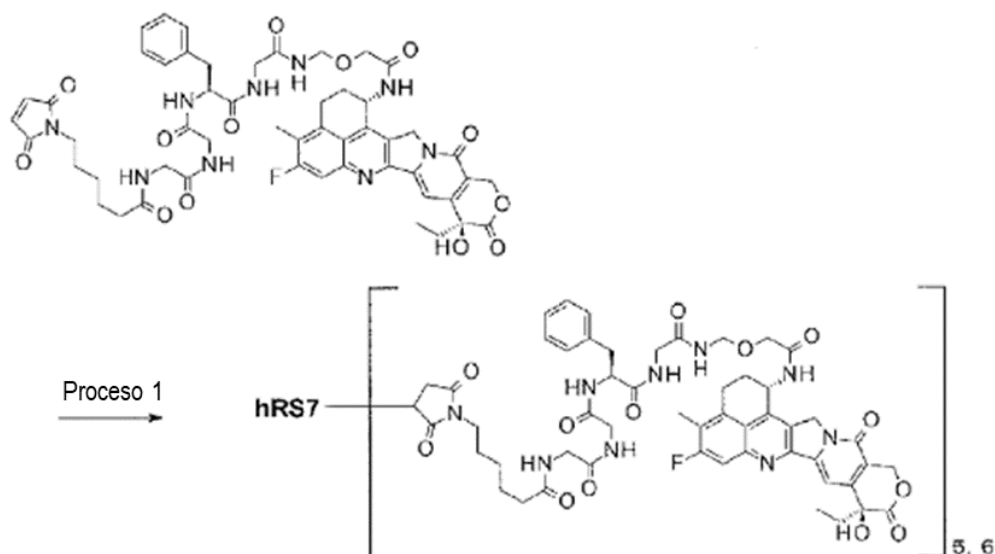
Conjugación entre el anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras agitar la solución anterior durante 10 minutos en un baño de agua a 15 °C, una solución de dimetil sulfoxido (0,162 ml; 5,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 8 del Ejemplo 14 se añadió gradualmente gota a gota y se agitó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0418 ml; 12,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a lo anterior y se agitó para finalizar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1 para dar 21,0 ml de una solución que contiene el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos comunes E y F descritos en el Método de producción 1 se usaron  $\epsilon_{D,280} = 5178$  (valor promedio medido), y  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (valor promedio medido), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 2,26 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 47,5 mg (95 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común E: 3,5, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común F: 3,6.

[Ejemplo de referencia 18: Producción de hRS7 ADC (10)]

[Fórmula 34]



Proceso 1: Conjugado fármaco-anticuerpo (10)

- 5 Reducción del anticuerpo: El hRS7 producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (usando como coeficiente de absorción a 280 nm, 1,56)) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (2,0 ml) se recogió en un tubo de 4 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 ml; 5,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0299 ml). Tras confirmar que la solución tenía pH  $7,0 \pm 0,1$ , el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

- 15 Conjugación entre el anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras incubar la solución anterior durante 10 minutos en un baño de agua a 15 °C, una solución de dimetil sulfoxido (0,1269 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 8 del Ejemplo 14 se añadió a lo anterior y se incubó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0190 ml; 13,8 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a lo anterior y se agitó usando un rotor de tubos para finalizar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.

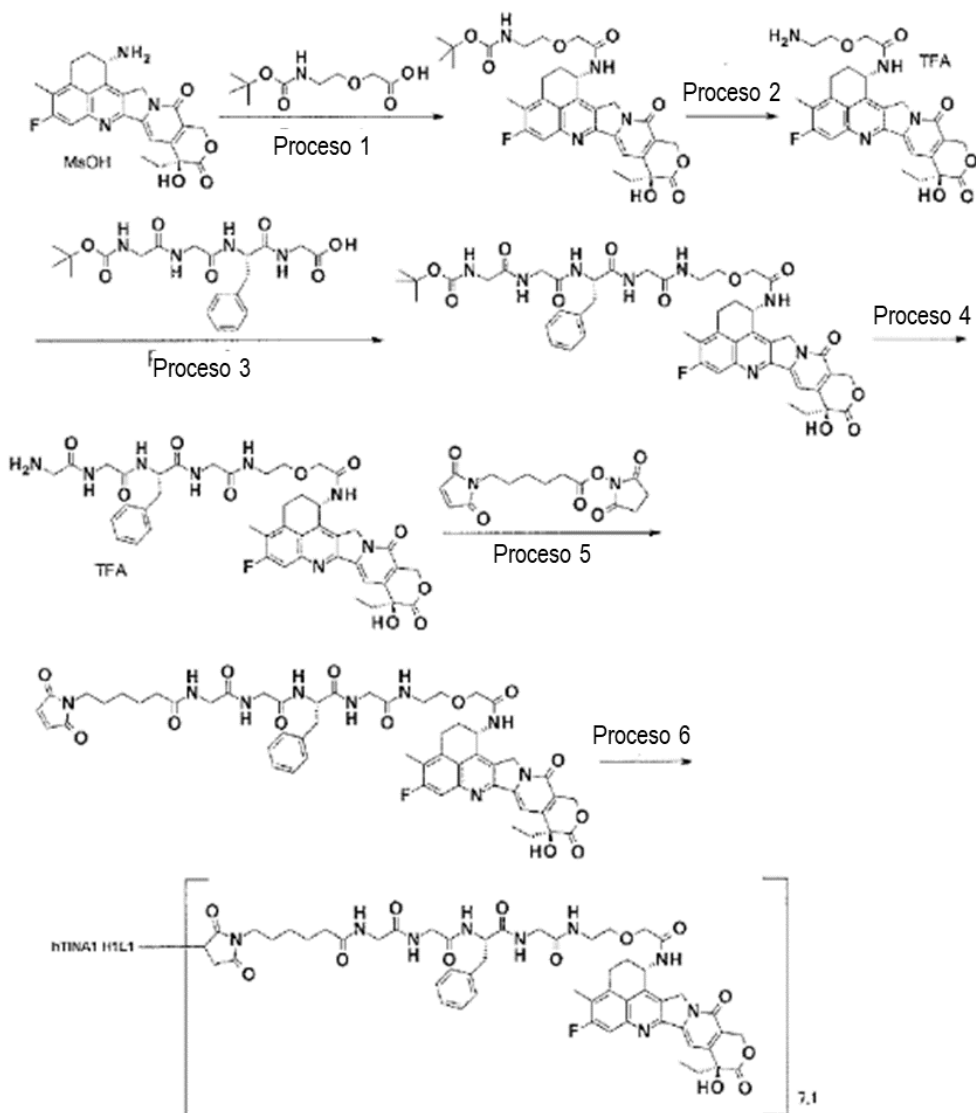
- 20 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1 para dar 9,00 ml de una solución que contiene el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento común E descrito en el Método de producción 1 se usaron  $\epsilon_{D,280} = 5178$  (valor promedio medido), y  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (valor promedio medido), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

- 25 Concentración de anticuerpo: 2,07 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 18,6 mg (93 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común E: 5,6.

[Ejemplo 19: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (11)]

[Fórmula 35]





Proceso 1: [2-(2-[[[(1S,9S)-9-Etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino]-2-oxoetoxi)etil]carbamato de terc-butilo

5 Se hizo reaccionar mesilato de exatecano (3,10 g, 5,47 mol) de la misma forma que en el Proceso 1 del Ejemplo 1 usando ácido {2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]etoxi}acético (J. Med. Chem., 1992, Vol. 35, pág. 2928; 1,55 g, 6,01 mmol) en lugar de ácido 4-(*tert*-Butoxicarbonilamino)butanoico para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (2,56 g, 73 %).

10 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,26 (9H, s), 1,81-1,91 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 3,08-3,26 (4H, m), 3,43-3,53 (2H, m), 4,00 (1H, d, J = 15,1 Hz), 4,05 (1H, d, J = 15,1 Hz), 5,14 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,22 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,40 (1H, d, J = 16,6 Hz), 5,44 (1H, d, J = 16,6 Hz), 5,59-5,66 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,86 (1H, t, J = 5,4 Hz), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d, J = 10,9 Hz), 8,49 (1H, d, J = 9,1 Hz).  
EM (CLEM) m/z: 637 (M+H)<sup>+</sup>.

Proceso 2: Trifluoroacetato de 2-(2-Aminoetoxi)-N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]acetamida

15 El compuesto (1,50 g, 2,36 mol) obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 2 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (1,50 g, cuantitativo).

20 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,5 Hz), 1,81-1,92 (2H, m), 2,15-2,23 (2H, m), 2,41 (3H, s), 3,05 (2H, t, J = 5,1 Hz), 3,15-3,23 (2H, m), 3,71 (2H, t, J = 5,1 Hz), 4,10 (2H, s), 5,19 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,24 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,43 (2H, s), 5,58-5,66 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,33 (1H, s), 7,73-7,84 (4H, m), 8,55 (1H, d, J = 9,1 Hz).  
EM (CLEM) m/z: 537 (M+H)<sup>+</sup>.

Proceso 3: N-(*tert*-Butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-(2-[[[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-

2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)etil]glicinamida

El compuesto (554 mg, 0,85 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 3 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto del título (775 mg, 95 %).

5 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,85 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,36 (9H, s), 1,78-1,89 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H, dd, J = 13,4, 9,8 Hz), 2,95 (1H, dd, J = 13,4, 4,3 Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,23-3,32 (2H, m), 3,40-3,62 (8H, m), 3,73 (1H, dd, J = 16,5, 5,5 Hz), 4,03 (2H, s), 4,39-4,47 (1H, m), 5,17 (1H, d, J = 18,9 Hz), 5,25 (1H, d, J = 18,9 Hz), 5,41 (1H, d, J = 16,8 Hz), 5,45 (1H, d, J = 16,8 Hz), 5,57-5,64 (1H, m), 6,54 (1H, s), 6,99 (1H, t, J = 5,8 Hz), 7,13-7,26 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,76-7,82 (2H, m), 7,90 (1H, t, J = 5,2 Hz), 8,13 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,27 (1H, t, J = 5,8 Hz), 8,49 (1H, d, J = 8,5 Hz).  
10 EM (CLEM) m/z: 955 (M+H)<sup>+</sup>.

Proceso 4: Trifluoroacetato de glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-(2-[[[1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)etil]glicinamida

15 El compuesto (630 mg, 0,659 mmol) obtenido en el Proceso 3 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 4 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto del título (588 mg, 92 %).  
RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,86 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,79-1,90 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H, dd, J = 13,4, 10,1 Hz), 2,99 (1H, dd, J = 13,4, 4,3 Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,24-3,32 (3H, m), 3,41-3,71 (7H, m), 3,86 (1H, dd, J = 16,8, 5,8 Hz), 4,04 (2H, s), 4,52 (1H, td, J = 9,0, 4,1 Hz), 5,17 (1H, d, J = 18,9 Hz), 5,25 (1H, d, J = 18,9 Hz), 5,41 (1H, d, J = 16,5 Hz), 5,45 (1H, d, J = 16,5 Hz), 5,56-5,65 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,13-7,26 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,80 (1H, d, J = 11,0 Hz), 7,87-8,01 (4H, m), 8,29-8,36 (2H, m), 8,46-8,55 (2H, m).  
20 EM (CLEM) m/z: 855 (M+H)<sup>+</sup>.

Proceso 5: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-(2-[[[1S, 9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10, 13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H, 12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)etil]glicinamida

25 El compuesto (240 mg, 0,247 mmol) obtenido en el Proceso 4 anterior se hizo reaccionar de la misma forma que en el Proceso 5 del Ejemplo 1 usando trietilamina (31,4 µl, 0,22 mmol) en lugar de diisopropiletilamina y hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida (95,3 mg, 0,31 mmol) en lugar de 3-(2-(2-(3-maleinimidapropanamida)etoxi)etoxi)propanoato de N-succinimidilo para proporcionar el compuesto del título (162 mg, 62 %).  
30 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,86 (3H, t, J = 7,6 Hz), 1,13-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,78-1,90 (2H, m), 2,09 (2H, t, J = 7,6 Hz), 2,14-2,21 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,74 (1H, dd, J = 13,6, 9,7 Hz), 2,96 (1H, dd, J = 13,6, 4,5 Hz), 3,08-3,24 (1H, m), 3,24-3,30 (1H, m), 3,33-3,40 (4H, m), 3,47-3,68 (7H, m), 3,72 (1H, dd, J = 16,6, 5,7 Hz), 4,03 (2H, s), 4,42 (1H, td, J = 8,6, 4,2 Hz), 5,17 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,25 (1H, d, J = 18,7 Hz), 5,40 (1H, d, J = 17,2 Hz), 5,44 (1H, d, J = 17,2 Hz), 5,57-5,64 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,13-7,25 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,81 (2H, m), 7,99 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,03-8,11 (2H, m), 8,22 (1H, t, J = 5,7 Hz), 8,47 (1H, d, J = 9,1 Hz).  
35 EM (CLEM) m/z: 1048 (M+H)<sup>+</sup>.

Proceso 6: Conjugado fármaco-anticuerpo (11)

40 Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (usando como coeficiente de absorción a 280 nm, 1,54)) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (3,0 ml) se recogió en un recipiente de 15 ml, se cargó con una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0488 ml) con agitación, y a continuación se agitó a 37 °C durante 10 minutos. Tras añadir la anterior a una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0972 ml; 5,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) con agitación y confirmación posterior de que la solución tenía un pH de 7,0 ± 0,1, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante agitación a 37 °C durante 1 hora.  
45

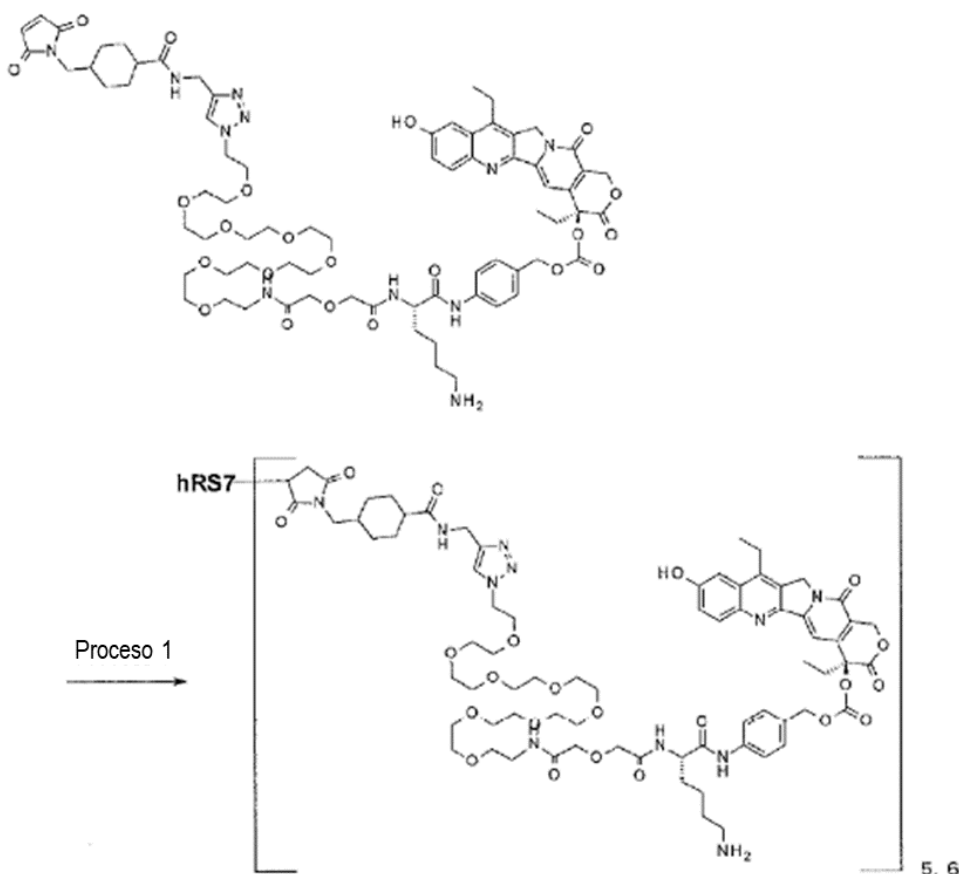
Conjugación entre el anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras agitar la solución anterior durante 10 minutos en un baño de agua a 15 °C, una solución de dimetil sulfóxido (0,2333 ml; 12,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 8 del Ejemplo 11 se añadió gradualmente gota a gota y se agitó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo en un baño de agua a 15 °C durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,0251 ml; 12,9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a lo anterior y se agitó para finalizar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos.  
50

55 Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1 para dar 14 ml de una solución que contiene el conjugado fármaco-anticuerpo del título. Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos comunes E y F descritos en el Método de producción 1 se usaron ε<sub>D,280</sub> = 5193 (valor promedio medido), y ε<sub>D,370</sub> = 20347 (valor promedio medido), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1,93 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 27,0 mg (90 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común E: 7,1, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común F: 7,0.

5 [Ejemplo de referencia 2: Producción de hRS7-CL2A-SN38 (12)]

[Fórmula 36]



Proceso 1: Conjugado fármaco-anticuerpo (12)

10 Reducción del anticuerpo: El hRS7 producido en el Ejemplo de Referencia 1 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (usando como coeficiente de absorción a 280 nm, 1,54)) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (10,0 ml) se recogió en un tubo de 50 ml y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 ml; 4,6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 ml). Tras confirmar que la solución tenía pH 7,4 ± 0,1, el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

20 Conjugación entre el anticuerpo y enlazador de fármaco: Tras incubar la solución anterior durante 10 minutos en un baño de agua a temperatura normal, se añadió a lo anterior una solución de dimetil sulfóxido (0,567 ml). Posteriormente, una solución de dimetilsulfóxido que contenía 10 mM de CL2A-SN38 sinterizado de acuerdo con la publicación de patente de los Estados Unidos n.º 2011/0293513 (0,635 ml; 9,2 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a lo anterior y se agitó usando un rotor de tubos para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, una solución acuosa (0,127 ml; 18,4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) se añadió a lo anterior y se agitó para finalizar la reacción del enlazador de fármaco a temperatura ambiente durante 20 minutos más.

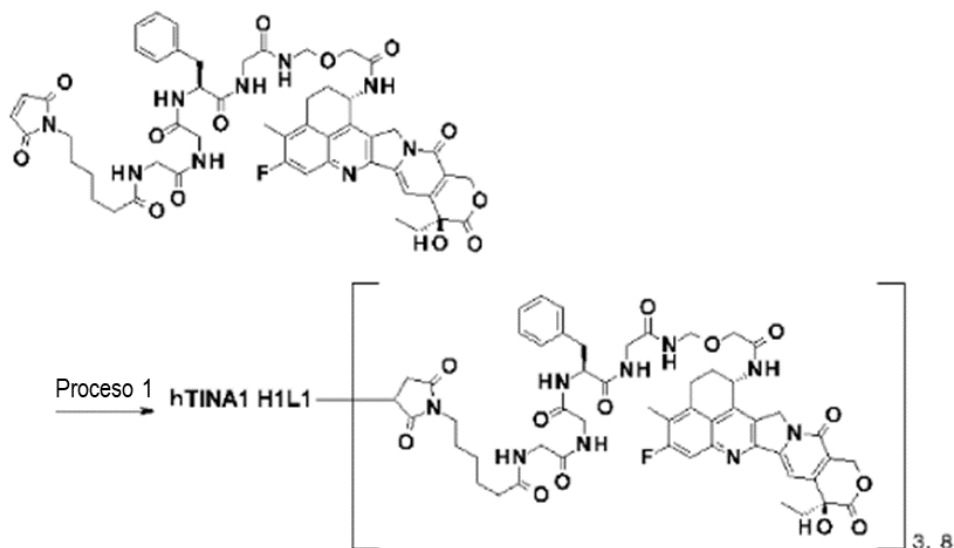
25 Purificación: La solución de reacción anterior se sometió repetidamente dos veces a filtración en gel y purificación como se describe en el Procedimiento común D del Método de producción y posteriormente se sometió análogamente a purificación mediante filtración en gel con la columna NAP-25 usando una solución de trehalosa

25 mM que contiene polisorbato 80 (0,01 %). Después, el eluato obtenido (35 ml) se criodesecó. Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento común E descrito en el Método de producción 1 para el eluato antes de la criodesecación, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

- 5 Concentración de anticuerpo: 2,78 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 97,3 mg (97 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo: 5,6.

**[Ejemplo 20: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (13)]**

[Fórmula 37]



Proceso 1: Conjugado fármaco-anticuerpo (13)

- 10 Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 se preparó para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml por sustitución del medio con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (usando como coeficiente de absorción a 280 nm, 1,54) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (100 ml) se introdujo en un matraz Erlenmeyer de policarbonato de 250 ml, se cargó con una solución acuosa de hidrogenofosfato dipotásico 1 M (1,4 ml) a temperatura ambiente con agitación mediante
- 15 agitador magnético, y a continuación se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (1,62 ml; 2,5 equivalentes por molécula de anticuerpo). Tras confirmar que la solución tenía pH  $7,0 \pm 0,1$ , la agitación se finalizó, y el enlace disulfuro en la parte de la bisagra del anticuerpo se redujo mediante incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 horas.

- 20 Conjugación entre el anticuerpo y enlazador de fármaco: Después de enfriar la solución anterior a  $15^\circ\text{C}$ , se añadió gradualmente DMSO (3,24 ml) gota a gota con agitación a lo anterior. Posteriormente, una solución de DMSO que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 8 del Ejemplo 14 (1,76 ml; 5,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió gradualmente gota a gota al anterior. Esta solución se agitó para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo a  $15^\circ\text{C}$  durante 1 hora. A continuación, una solución acuosa (0,324 ml; 5,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió a lo anterior con agitación y se incubó para finalizar la reacción del enlazador de fármaco sin reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos más.

- 25 Purificación: Una solución acuosa de ácido acético al 20 % (aproximadamente 0,52 ml) y ABS (100 ml) se añadieron gradualmente a la solución anterior con agitación para ajustar el pH de la solución a  $5,5 \pm 0,1$ . Esta solución se sometió a microfiltración (0,45  $\mu\text{m}$ , membrana de PVDF) para eliminar la turbidez de color blanco y proporcionar aproximadamente 200 ml de un filtrado. Este filtrado se sometió a purificación mediante ultrafiltración usando un
- 30 aparato de ultrafiltración compuesto por una membrana de ultrafiltración (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Ultracell 30 kDa), una bomba de tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump modelo 77521-40, Pump Head modelo 7518-00), y un tubo (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16). Específicamente, mientras el ABS se añadió gota a gota (un total de 1600 ml) como solución tampón para purificación a la solución de reacción, se
- 35 llevó a cabo la purificación por ultrafiltración para eliminar los enlazadores de fármaco no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular, sustituyendo también la solución tampón con ABS, y concentrando además la solución. La solución obtenida y purificada se sometió a microfiltración (0,22  $\mu\text{m}$ , membrana de PVDF) para dar 88 ml de una solución que contenía el conjugado de fármaco-anticuerpo del título.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento común E y el Procedimiento común F (se usaron  $\epsilon_{D,280} = 5178$ , y  $\epsilon_{D,370} = 20217$ ), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 9,96 mg/ml, rendimiento de anticuerpo: 876 mg (88 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común E: 3,8, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido según el Procedimiento común F: 3,8.

#### 5 **[Ejemplo 21: Evaluación del efecto antitumoral de ADC] 21-a) Efecto antitumoral de ADC - (1)**

Ratón: Ratones hembra BALB/c-nu/nu de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) se aclimataron durante de 4 a 7 días en condiciones SPF antes de su uso en el experimento. Los ratones se alimentaron con pienso sólido esterilizado (FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd) y se les proporcionó agua de grifo esterilizada (preparada mediante la adición de 5 a 15 ppm de solución de hipoclorito sódico).

10 Ensayo y cálculo de la expresión: En todos los estudios, el eje mayor y el eje menor del tumor se midieron dos veces a la semana mediante el uso de un calibre digital (CD-15C, Mitutoyo Corp.), y se calculó el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ). La expresión de cálculo es como se muestra a continuación.

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{Eje mayor (mm)} \times [\text{Eje menor (mm)}]^2$$

15 Todos los conjugados de fármaco-anticuerpo se diluyeron con solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) y se usaron a un volumen de 10 ml/kg para la administración intravenosa en la cola de cada ratón. Una línea de células de cáncer colorrectal humano COLO205 se adquirió de la ATCC y se suspendió en solución salina fisiológica.  $2 \times 10^6$  células de la suspensión se trasplantaron por vía subcutánea en el abdomen derecho de cada ratón hembra BALB/c-nu/nu (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 7. El conjugado fármaco-anticuerpo (1), (6), o (12) se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la cola de cada ratón los Días 7, 14, y 21. El anticuerpo no conjugado hTINA1-H1L1 y el anticuerpo hRS7 se administraron, cada uno de ellos, como control negativo a una dosis de 25 mg/kg por la misma vía que anteriormente. La administración del conjugado fármaco-anticuerpo (1) o (6) disminuyó notablemente el volumen tumoral en comparación con la administración del conjugado fármaco-anticuerpo (12), y ambos conjugados fármaco-anticuerpo ejerció un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 13). En el dibujo, la abscisa representa gráficamente el número de días, y la ordenada representa gráficamente el volumen tumoral.

#### 21-b) Efecto antitumoral de ADC - (2)

Una línea de células de adenocarcinoma pancreático humano Bx-PC3 adquirida de la ATCC se trasplantó a cada ratón hembra BALB/c-nu/nu y después se pasó como injerto tumoral sólido. Este injerto tumoral se trasplantó por vía subcutánea al abdomen derecho de cada ratón hembra BALB/c-nu/nu (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 16. El conjugado fármaco-anticuerpo (1), (6), o (12) se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la cola de cada ratón los Días 16, 23, y 30. El anticuerpo no conjugado hTINA1-H1L1 y el anticuerpo hRS7 se administraron, cada uno de ellos, como control negativo a una dosis de 25 mg/kg por la misma vía que anteriormente. La administración del conjugado fármaco-anticuerpo (1) o (6) disminuyó notablemente el volumen tumoral en comparación con la administración del conjugado fármaco-anticuerpo (12), y ambos conjugados fármaco-anticuerpo ejerció un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 14).

#### 21-c) Efecto antitumoral de ADC - (3)

40 Una línea de células de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 adquirida de la ATCC se trasplantó a cada ratón hembra BALB/c-nu/nu y después se pasó como injerto tumoral sólido. Este injerto tumoral se trasplantó por vía subcutánea al abdomen derecho de cada ratón hembra BALB/c-nu/nu (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 18. El conjugado fármaco-anticuerpo (1), (6), o (12) se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la cola de cada ratón los Días 18, 25, y 32. El anticuerpo no conjugado hTINA1-H1L1 y el anticuerpo hRS7 se administraron, cada uno de ellos, como control negativo a una dosis de 25 mg/kg por la misma vía que anteriormente. La administración del conjugado fármaco-anticuerpo (1) o (6) disminuyó notablemente el volumen tumoral en comparación con la administración del conjugado fármaco-anticuerpo (12), y ambos conjugados fármaco-anticuerpo ejerció un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 15).

#### 21-d) Efecto antitumoral de ADC - (4)

50 COLO205 se trasplantó por vía subcutánea a cada ratón hembra BALB/c-nu/nu de la misma forma que en el Ejemplo 21-a) (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 11. El conjugado fármaco-anticuerpo (2) o (5) a una dosis de 10 mg/kg y el conjugado fármaco-anticuerpo (7) o (10) a una dosis de 3 mg/kg se administraron por vía intravenosa, respectivamente, en la cola de cada ratón los Días 11, 18, y 25. Todos los conjugados fármaco-anticuerpo (2), (5), (7), y (10) administrados ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 16).

#### 21-e) Efecto antitumoral de ADC - (5)

55 Bx-PC3 se trasplantó por vía subcutánea a cada ratón hembra BALB/c-nu/nu de la misma forma que en el Ejemplo 21-b) (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 25. El conjugado fármaco-anticuerpo (2), (5), (7), o (10) se administró por vía intravenosa a una dosis de 3 mg/kg en la cola de cada ratón los Días 25 y 32. Todos los

conjugados fármaco-anticuerpo (2), (5), (7), y (10) administrados ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 17).

21-f) Efecto antitumoral de ADC - (6)

- 5 COLO205 se trasplantó por vía subcutánea a cada ratón hembra BALB/c-nu/nu de la misma forma que en el Ejemplo 21-a) (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 9. El conjugado fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) se administró por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en la cola de cada ratón los Días 9 y 16. Todos los conjugados fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), y (9) administrados ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 18).

21-g) Efecto antitumoral de ADC - (7)

- 10 Bx-PC3 se trasplantó por vía subcutánea a cada ratón hembra BALB/c-nu/nu de la misma forma que en el Ejemplo 21-b) (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 21. El conjugado fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) se administró por vía intravenosa a una dosis de 3 mg/kg en la cola de cada ratón los Días 21 y 28. Todos los conjugados fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), y (9) administrados ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 19).

15 21-h) Efecto antitumoral de ADC - (8)

- 20  $8 \times 10^6$  células de una línea de células de cáncer de ovario humano NIH:OVCAR-3 adquirida de la ATCC se suspendieron en Matrigel (Becton, Dickinson and Company) y se trasplantaron por vía subcutánea a cada ratón hembra BALB/c-nu/nu (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 25. El conjugado fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) se administró por vía intravenosa a una dosis de 3 mg/kg en la cola de cada ratón el Día 25. Todos los conjugados fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), y (9) administrados ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 20).

21-i) Efecto antitumoral de ADC - (9)

- 25  $1 \times 10^7$  células de una línea de células de cáncer gástrico humano NCI-N87 adquirida de la ATCC se suspendieron en solución salina fisiológica y se trasplantaron por vía subcutánea a cada ratón hembra BALB/c-nu/nu (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 6. El conjugado fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) se administró por vía intravenosa a una dosis de 3 mg/kg en la cola de cada ratón el Día 6. Todos los conjugados fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), y (9) administrados ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 21).

21-j) Efecto antitumoral de ADC - (10)

- 30  $5 \times 10^6$  células de una línea de células de cáncer de pulmón humano NCI-H292 adquirida de la ATCC se suspendieron en solución salina fisiológica y se trasplantaron por vía subcutánea a cada ratón hembra BALB/c-nu/nu (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 9. El conjugado fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) se administró por vía intravenosa a una dosis de 3 mg/kg en la cola de cada ratón el Día 9. Todos los conjugados fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), y (9) administrados ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 22).

35 21-k) Efecto antitumoral de ADC - (11)

- 40  $3 \times 10^6$  células de una línea de células de cáncer de garganta humano FaDu adquirida de la ATCC se suspendieron en solución salina fisiológica y se trasplantaron por vía subcutánea a cada ratón hembra BALB/c-nu/nu (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 11. El conjugado fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) se administró por vía intravenosa a una dosis de 3 mg/kg en la cola de cada ratón el Día 11. Todos los conjugados fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), y (9) administrados ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 23).

21-l) Efecto antitumoral de ADC - (12)

- 45  $4 \times 10^6$  células de una línea de células de adenocarcinoma pancreático humano CFPAC-1 adquirida de la ATCC se suspendieron en solución salina fisiológica y se trasplantaron por vía subcutánea a cada ratón hembra BALB/c-nu/nu (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 14. El conjugado fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), o (9) se administró por vía intravenosa a una dosis de 3 mg/kg en la cola de cada ratón el Día 14. Todos los conjugados fármaco-anticuerpo (3), (4), (8), y (9) administrados ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 24).

21-m) Efecto antitumoral de ADC - (13)

- 50 CFPAC-1 se trasplantó por vía subcutánea a cada ratón hembra BALB/c-nu/nu de la misma forma que en el Ejemplo 21-1(Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 14. El conjugado fármaco-anticuerpo (8), o (13) se administró por vía intravenosa a una dosis de 1 mg/kg en la cola de cada ratón el Día 14. Todos los conjugados fármaco-anticuerpo (8) o (13) administrados ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 25).

## 21-n) Efecto antitumoral de ADC - (14)

3 x 10<sup>6</sup> células de una línea de células de adenocarcinoma pancreático humano HPAC adquirida de la ATCC se suspendieron en solución salina fisiológica y se trasplantaron por vía subcutánea a cada ratón hembra BALB/c-nu/nu (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 12. El conjugado fármaco-anticuerpo (8), o (13) se administró por vía intravenosa a una dosis de 3 mg/kg en la cola de cada ratón el Día 12. Todos los conjugados fármaco-anticuerpo (8) o (13) administrados ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 26).

## 21-o) Efecto antitumoral de ADC - (15)

Tejidos de cáncer esofágico humano obtenido de la Japan Health Sciences Foundation se trasplantaron por vía subcutánea a cada ratón NOG (Central Institute for Experimental Animals) y se dejaron crecer. El injerto tumoral obtenido se trasplantó adicionalmente por vía subcutánea al cada ratón hembra NOD-scid (Charles River Laboratories Japan, Inc.) (Día 0), y los ratones se agruparon aleatoriamente el Día 27. El conjugado fármaco-anticuerpo (8), o (13) se administró por vía intravenosa a una dosis de 3 mg/kg en la cola de cada ratón el Día 27. Ambos conjugados fármaco-anticuerpo (8) o (13) administrados ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 27).

15 **[Ejemplo 22: Evaluación del efecto inhibitor sobre el crecimiento celular de ADC]**

BxPC3, NCI-H292, NIH:OVCAR-3, CFPAC-1, FaDu, una línea de células de cáncer de pulmón humano Calu-3 (ATCC), y una línea de células de cáncer de ovario humano CaOV3 (ATCC) como líneas celulares positivas para el antígeno TROP2, y una línea de células de cáncer de pulmón humano Calu-6 (ATCC) y una línea de células de melanoma cutáneo humano A375 (ATCC) como líneas celulares negativas para el antígeno TROP2 se usaron en la evaluación del efecto inhibitor del crecimiento celular de cada ADC. BxPC3 y NCI-H292 se prepararon con medio RPMI1640 (Gibco) que contenía suero de feto bovino al 10 % (Moregate Biotech), NIH:OVCAR-3 se preparó con medio RPMI1640 Medium que contenía suero de feto bovino al 20 % y 0,01 mg/ml de insulina (Invitrogen Corp.), CFPAC-1 se preparó con medio de Dulbecco modificado por Iscove (Gibco) que contenía suero de feto bovino al 10%, FaDu, Calu-3, y Calu-6 se prepararon con medio esencial Mínimo de Eagle (ATCC) que contenía suero de feto bovino al 10%, y CaOV3 y A375 se prepararon con medio Eagle modificado por Dulbecco (Gibco) que contenía suero de feto bovino al 10%, para tener cada uno de ellos 2,2 x 10<sup>6</sup> células/ml. Cada suspensión se sembró a 90 µl/pocillo en una microplaca de 96 pocillos de cultivo celular. El conjugado fármaco-anticuerpo (4) u (8) diluido con medio RPMI1640 hasta 100 nM, 20 nM, 4 nM, 0,8 nM, 0,16 nM, 0,032 nM, o 0,0064 nM, o medio RPMI1640 para comparación se añadió a lo anterior a 10 µl/pocillo, y las células se cultivaron con 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 6 días. Después del cultivo, la microplaca se extrajo de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de cultivo se cargó con una cantidad equivalente de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) y se agitó durante 10 minutos usando un mezclador de placas. Tras la lisis celular, se midió la intensidad de la luminiscencia usando un lector de placas.

La tasa de inhibición del crecimiento celular tras el cultivo de 6 días se calcula de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$35 \quad \text{Tasa de inhibición del crecimiento celular (\%)} = a / b \times 100$$

a: Valor promedio de los pocillos suplementados con muestra tras el cultivo de 6 días - Valor promedio de los pocillos no suplementados con muestra al inicio del cultivo

b: Valor promedio de los pocillos suplementados con medio tras el cultivo de 6 días - Valor promedio de los pocillos no suplementados con medio al inicio del cultivo

40 El valor IG<sub>50</sub> se calculó de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{IG}_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog}((50 - f) \times (\text{LOG}_{10} (d) - \text{LOG}_{10} (c)) / (f - e) + \text{LOG}_{10} (d))$$

c: Concentración de la muestra c

d: Concentración de la muestra d

e: Tasa de inhibición del crecimiento celular para la concentración de la muestra c

45 f: Tasa de inhibición del crecimiento celular para la concentración de la muestra d

Las concentraciones c y d establecen la relación c > d que cruza el 50 % de la tasa de inhibición del crecimiento celular.

Los conjugados de fármaco-anticuerpo (4) y (8) mostraron un efecto de inhibición del crecimiento celular de IG<sub>50</sub> < 1 (nM) sobre las líneas de células positivas para el antígeno TROP2 BxPC3, NCI-H292, NIH:OVCAR-3, CFPAC-1, FaDu, Calu-3, y CaOV3. Por otra parte, estos conjugados de fármaco-anticuerpo no mostraron un efecto de inhibición del crecimiento celular (> 100 (nM)) sobre las líneas de células negativas para el antígeno TROP2 Calu-6 y A375.

Texto libre del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1: Secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada del

## ES 2 703 903 T3

anticuerpo TINA1  
SEQ ID NO: 2: Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo TINA1  
SEQ ID NO: 3: Secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo TINA1  
5 SEQ ID NO: 4: Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo TINA1  
SEQ ID NO: 5: Secuencia de nucleótidos que codifica una señal de secreción de la cadena κ humana y una región constante de la cadena κ humana  
SEQ ID NO: 6: Secuencia de nucleótidos que codifica una señal de secreción de la cadena pesada humana y una región constante de la IgG1 humana  
10 SEQ ID NO: 7: Secuencia de nucleótidos de una cadena pesada del anticuerpo cTINA1  
SEQ ID NO: 8: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo cTINA1  
SEQ ID NO: 9: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo cTINA1  
SEQ ID NO: 10: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo cTINA1  
15 SEQ ID NO: 11: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-H1  
SEQ ID NO: 12: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-H1  
SEQ ID NO: 13: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-H2  
SEQ ID NO: 14: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-H2  
SEQ ID NO: 15: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-H3  
SEQ ID NO: 16: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-H3  
20 SEQ ID NO: 17: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-L1  
SEQ ID NO: 18: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-L1  
SEQ ID NO: 19: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-L2  
SEQ ID NO: 20: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-L2  
SEQ ID NO: 21: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-L3  
25 SEQ ID NO: 22: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-L3  
SEQ ID NO: 23: Secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo TINA1  
SEQ ID NO: 24: Secuencia de aminoácidos de CDRH2 del anticuerpo TINA1  
SEQ ID NO: 25: Secuencia de aminoácidos de CDRH3 del anticuerpo TINA1  
SEQ ID NO: 26: Secuencia de aminoácidos de CDRL1 del anticuerpo TINA1  
30 SEQ ID NO: 27: Secuencia de aminoácidos de CDRL2 del anticuerpo TINA1  
SEQ ID NO: 28: Secuencia de aminoácidos de CDRL3 del anticuerpo TINA1  
SEQ ID NO: 29: Secuencia de nucleótidos de una cadena pesada del anticuerpo hRS7  
SEQ ID NO: 30: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo hRS7  
SEQ ID NO: 31: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo hRS7  
35 SEQ ID NO: 32: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo hRS7  
SEQ ID NO: 33: Cebador mG2aVR2  
SEQ ID NO: 34: Cebador mKVR2  
SEQ ID NO: 35: Cebador 3.3-F1  
SEQ ID NO: 36: Cebador 3.3-R1  
40 SEQ ID NO: 37: Cebador TINA1H-F  
SEQ ID NO: 38: Cebador TINA1H-R  
SEQ ID NO: 39: Cebador TINA1L-F  
SEQ ID NO: 40: Cebador TINA1L-R  
SEQ ID NO: 41: Cebador EG-Inf-F  
45 SEQ ID NO: 42: Cebador EG1-Inf-R  
SEQ ID NO: 43: Cebador CM-LKF  
SEQ ID NO: 44: Cebador KCL-Inf-R  
SEQ ID NO: 45: Secuencia de aminoácidos AspGlyGlyPhe  
SEQ ID NO: 46: Secuencia de aminoácidos GluGlyGlyPhe  
50 SEQ ID NO: 47: Secuencia de aminoácidos GlyGlyPheGly  
SEQ ID NO: 48: Secuencia de aminoácidos SerGlyGlyPhe  
SEQ ID NO: 49: Secuencia de aminoácidos LysGlyGlyPhe  
SEQ ID NO: 50: Secuencia de aminoácidos AspGlyGlyPheGly  
SEQ ID NO: 51: Secuencia de aminoácidos GlyGlyPheGlyGly  
55 SEQ ID NO: 52: Secuencia de aminoácidos AspAspGlyGlyPheGly  
SEQ ID NO: 53: Secuencia de aminoácidos LysAspGlyGlyPheGly  
SEQ ID NO: 54: Secuencia de aminoácidos GlyGlyPheGlyGlyGlyPhe

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Daiichi Sankyo Company, Limited  
60 <120> CONJUGADO DE FÁRMACO-ANTICUERPO ANTI-TROP2  
<130> PD20-9007WO  
<150> JP2013-267548



<151> 25/12/2013

<160> 44

<170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1

<211> 363

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 1

```

cagatccagt tggcgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaggatc      60
tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca actgctggaa tgcagtgggt gcaaaagatg      120
ccagaaagg gtttgaagtg gattggctgg ataaacaccc actctggagt gcaaaaatat      180
gcagaagact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcatat      240
ttacagataa gcaacctcaa aatgaggac acgactacgt atttctgtgc gagatcgggg      300
ttcggtagta gctactggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccgcggt caccgtctcc      360
tca                                                                           363
    
```

10

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

```

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe
50           55           60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr Tyr Phe Cys
85           90           95

Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100          105          110

Ala Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115          120
    
```

15

<210> 3

<211> 327

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

ES 2 703 903 T3

<400> 3

gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60  
 atcacctgca aggccagtc ggatgtgagt actgctgtag cctggtatca acagaaacca 120  
 ggacaatctc ctaaactgct gatttactog gcatoctacc gctacactgg agtccctgat 180  
 cgcttcaactg gcagtggatc tgggacggct ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240  
 gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatatta ctccgctcac gttcgggtgct 300  
 gggaccaagc tggagctgaa acgggct 327

<210> 4

<211> 109

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

5

<400> 4

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

100

105

<210> 5

<211> 449

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 5

ES 2 703 903 T3

gcctccggac tctagagcca ccatggtgct gcagaccag gtgttcatct ccctgctgct 60  
 gtggatctcc ggcgcgtacg gcgatatcgt gatgattaaa cgtacgggtgg ccgccccctc 120  
 cgtgttcatc ttccccccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgct ccgtggtgtg 180  
 cctgctgaat aacttctacc ccagagaggg caaggtgcag tgggaaggtgg acaacgcctt 240  
 gcagtccggg aactcccagg agagcgtgac cgagcaggac agcaaggaca gcacctacag 300  
 cctgagcagc accctgacct tgagcaaagc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg 360  
 cgaggtgacc caccagggcc tgagctcccc cgtcaccaag agcttcaaca ggggggagtg 420  
 ttaggggccc gtttaaacgg gggaggcta 449

<210> 6  
 <211> 1132  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

gcctccggac tctagagcca ccatgaaaca cctgtggttc ttctcctgc tgggtggcagc 60  
 tcccagatgg gtgctgagcc aggtgcaatt gtgcagggcg ttagctcagc ctccaccaag 120  
 ggccaagcg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggcgg cacagccgcc 180  
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccctga ccgtgagctg gaactcaggc 240  
 gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctgc agtcctcagg actctactcc 300  
 ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca ccagacctc catctgcaac 360  
 gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac 420  
 aaaactcaca catgcccacc ctgcccagca cctgaactcc tgggggggacc ctcagtcttc 480  
 ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 540  
 gtgggtgggg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 600  
 gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccc cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg 660  
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 720  
 aaggtctcca acaaagccct ccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggc 780  
 cagccccggg aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 840  
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 900  
 gagagcaatg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc ctcccgtgct ggactccgac 960  
  
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggcaac 1020  
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacca gaagagcctc 1080  
 tcctgtctc ccggcaaatg agatatcggg cccgtttaa cgggggaggc ta 1132

ES 2 703 903 T3

<210> 7  
 <211> 1410  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 quimérico de murino-humano  
 <400> 7

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag      60
atccagttgg tgcagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caggatctcc      120
tgcaaggctt ctgggtatac cttcacaact gctggaatgc agtgggtgca aaagatgcca      180
ggaaagggtt tgaagtggat tggctggata aacaccact ctggagtgcc aaaatatgca      240
gaagacttca agggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcataatta      300
cagataagca acctcaaaaa tgaggacacg actacgtatt tctgtgagag atcggggttc      360
ggtagtagct actggtactt cgatgtctgg ggcgcagggg cgcggtcac cgtcagctca      420
gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggc      480
ggcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc      540
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca      600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc      720
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcca ccctgcccag cacctgaact cctgggggga      780
ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacct tcatgatctc ccggaccctt      840
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac      960
agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc     1080
aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacacct tgccccatc ccgggaggag     1140
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     1200
gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg     1260
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacia gagcaggtgg     1320
cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacia ccactacacc     1380

cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa                                         1410
    
```

10 <210> 8  
 <211> 470  
 <212> PRT

ES 2 703 903 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 quimérico de murino-humano

<400> 8

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
1 5 10 15

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

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

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Lys Trp Ile Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser  
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr  
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
115 120 125

Val Trp Gly Ala Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
180 185 190

ES 2 703 903 T3

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

ES 2 703 903 T3

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

5 <210> 9  
 <211> 702  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo TINA1 quimérico de murino-humano  
 <400> 9

```

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc      60
gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc      120
atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtag cctggtatca acagaaacca      180
ggacaatctc ctaaactgct gatttactcg gcacacctacc gctacactgg agtcctgat      240
cgcttcactg gcagtgatc tgggacggct ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct      300
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatatta ctccgctcac gttcgggtgct      360
gggaccaagc tggagctgaa acgggctgtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc      420
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac      480
cccagagagg ccaagtgca gtggaagggt gacaacgccc tgcaagtcgg gaactcccag      540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc      600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggaggt gt                                702
    
```

10 <210> 10  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo TINA1 quimérico de murino-humano  
 <400> 10

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

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
 20 25 30

ES 2 703 903 T3

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 35 40 45

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

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

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Phe Thr Ile Ser  
 85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr  
 100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 115 120 125

Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 11

<211> 1410

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 humanizado, tipo H1

<400> 11



ES 2 703 903 T3

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60

gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc 120

tgcaaggcca gcggctacac ctttaccacc gccggcatgc agtgggtgcg ccaggctcct 180

ggacagggcc tggaatggat gggctggatc aacaccaca gccggcgtgcc caaatagcc 240

gaggacttca agggcagagt gaccatcagc gccgacacca gcacctccac agcctacctg 300

cagctgagca gcctgaagtc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag aagcggcttc 360

ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca ccctcgtgac cgtcagctca 420

gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc 480

ggcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc 540

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca 600

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720

aatcttctg acaaaactca cacatgcca ccctgccag cacctgaact cctgggggga 780

ccctcagctc tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcctgatctc ccggaccct 840

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac 960

agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtccctgacc aggactggct gaatggcaag 1020

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080

aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag 1140

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200

gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg 1260

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320

cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacc 1380

cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa 1410

<210> 12

<211> 470

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 humanizado, tipo H1

<400> 12

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15

ES 2 703 903 T3

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

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

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala  
 65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270

ES 2 703 903 T3

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 13

<211> 1410

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 humanizado, tipo H2

<400> 13

ES 2 703 903 T3

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60  
 gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc 120  
 tgcaaggcca gcggctacac ctttaccacc gccggcatgc agtgggtgcg ccaggctcct 180  
 ggacagggcc tggaatggat gggctggatc aacaccacaca gcggcgtgcc caaatacgcc 240  
 gaggacttca agggcagagt gaccatcagc ctggacacca gcacctccac cgcctacctg 300  
 cagctgagca gcctgaagtc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag aagcggcttc 360  
 ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca ccctcgtgac cgtcagctca 420  
 gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc 480  
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc 540  
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca 600  
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720  
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc aacctgcccag cacctgaact cctgggggga 780  
 ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 840  
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac 960  
 agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 1080  
 aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1140  
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200  
 gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg 1260  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320  
 cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc 1380  
 cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa 1410

<210> 14

<211> 470

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 humanizado, tipo H2

<400> 14

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15

ES 2 703 903 T3

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

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

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser  
 85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270

ES 2 703 903 T3

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 15

<211> 1410

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 humanizado, tipo H3

<400> 15

ES 2 703 903 T3

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60  
atccagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gcgagagcgt gaaggtgtcc 120  
tgcaaggcca gcggctacac ctttaccacc gccggcatgc agtgggtgca gcagatgcct 180  
ggcaagggcc tggaatggat gggctggatc aacaccaca gcggcgtgcc caaatagcc 240  
gaggacttca agggcagagt gaccttcagc ctggacacca gcacctccac cgcctacctg 300  
cagctgagca gcctgaagtc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag aagcggcttc 360  
ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca ccctcgtgac cgtcagctca 420  
gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc 480  
ggcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc 540  
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca 600  
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660  
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720  
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcca ccctgccag cacctgaact cctgggggga 780  
ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 840  
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900  
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac 960  
agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 1020  
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080  
aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1140  
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200  
gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg 1260  
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320  
cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc 1380  
cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa 1410

<210> 16

<211> 470

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo TINA1 humanizado, tipo H3

<400> 16

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
1 5 10 15

ES 2 703 903 T3

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

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

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser  
 85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp



ES 2 703 903 T3

			260						265						270	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
		275					280					285				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
	290					295					300					
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	
305					310					315					320	
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	
				325					330					335		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	
			340					345					350			
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
		355					360					365				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	
	370					375					380					
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
385					390					395					400	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	
				405					410					415		
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
			420					425					430			
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
		435					440					445				
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	
	450					455					460					
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
465					470											

ES 2 703 903 T3

<210> 17  
 <211> 702  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo TINA1 humanizado, tipo L1  
 <400> 17

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc	60
gacatccaga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc	120
atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc acagccgtgg cctggatatca gcagaagcct	180
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgccagc	240
agatthttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc	300
gaggacttctg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac ctttggccag	360
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc	420
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac	480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcaagtccgg gaactcccag	540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc	600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggagt gt	702

10 <210> 18  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo TINA1 humanizado, tipo L1

15 <400> 18

ES 2 703 903 T3

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

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

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 35 40 45

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

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

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

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

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 19  
 <211> 702  
 <212> ADN

ES 2 703 903 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo TINA1 humanizado, tipo L2

<400> 19

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc	60
gacatcgtga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	120
atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc acagccgtgg cctggtatca gcagaagcct	180
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgcccagc	240
agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc	300
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac ctttgccag	360
ggcaccaagc tggaatcaa gcgtacggtg gccgccccct ccgtgttcat cttcccccc	420
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac	480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag	540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc	600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggagt gt	702

5

<210> 20

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo TINA1 humanizado, tipo L2

<400> 20

ES 2 703 903 T3

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

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
35 40 45

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

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

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

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

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230

ES 2 703 903 T3

<210> 21  
 <211> 702  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo TINA1 humanizado, tipo L3  
 <400> 21

```

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc      60
gacatcgtga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc      120
atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc acagccgtgg cctggtatca gcagaagccc      180
ggcaagcagc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgccagc      240
agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc      300
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac ctttggccag      360
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc      420
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac      480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag      540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc      600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggagt gt                          702
    
```

10 <210> 22  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo TINA1 humanizado, tipo L3

15 <400> 22

```

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

ES 2 703 903 T3

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 35 40 45

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

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

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

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

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

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

ES 2 703 903 T3

Thr Ala Gly Met Gln  
1 5

5 <210> 24  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*  
<400> 24

Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

10 <210> 25  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*  
<400> 25

Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

15 <210> 26  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*  
<400> 26

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala  
1 5 10

20 <210> 27  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*  
<400> 27

25 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
1 5

30 <210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*  
<400> 28

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr  
1 5

35 <210> 29  
<211> 1410  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 29



ES 2 703 903 T3

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60  
 gtgcagctgc agcagagcgg cagcgagctg aagaagcctg gcgccagcgt caaggtgtcc 120  
 tgcaaggcca gcggctacac cttcaccaac tacggcatga actgggtgaa gcaggcccca 180  
 ggccagggcc tgaagtggat gggctggatc aacacctaca ccggcgagcc cacctacacc 240  
 gacgacttca agggccgggt cgccttcagc ctggacacca gcgtgagcac cgcctacctg 300  
 cagatcagca gcctgaaggc cgacgatacc gccgtgtact tctgcgccag agggcgcttc 360  
 ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca gcctggtgac cgtgagctca 420  
 gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc 480  
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc 540  
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca 600  
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720  
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc aacctgcccag cacctgaact cctgggggga 780  
 ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 840  
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac 960  
 agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 1020  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 1080  
 aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1140  
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200  
 gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg 1260  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320  
 cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc 1380  
 cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa 1410

<210> 30  
 <211> 470  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 30

5

ES 2 703 903 T3

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
245 250 255

ES 2 703 903 T3

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

ES 2 703 903 T3

<210> 31  
 <211> 702  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 31

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60  
 gatatccagc tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgtcc 120  
 atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc attgccgtgg cctggtatca gcagaagccc 180  
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgcccagc 240  
 agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 300  
 gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac cttcggagcc 360  
 ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc 420  
 tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac 480  
 cccagagagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag 540  
 gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 600  
 ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660  
 ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggagt gt 702

<210> 32  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 32

ES 2 703 903 T3

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

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

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 35 40 45

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

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

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

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

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 33  
 <211> 30

# ES 2 703 903 T3

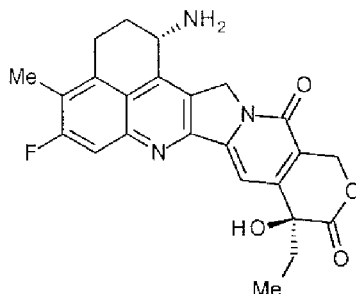
<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos del cebador mG2aVR2  
  
 5 <400> 33  
 agagttccag gtcaagggtca ctggctcagg 30  
  
 <210> 34  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos del cebador mKVR2  
  
 <400> 34  
 agtccaactg tcaggacgc catttgtcg 30  
  
 15 <210> 35  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> secuencia de nucleótidos del cebador 3.3-F1  
  
 <400> 35  
 tataccgtcg acctctagct agagcttggc 30  
  
 <210> 36  
 <211> 30  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos del cebador 3.3-R1  
  
 <400> 36  
 30 gctatggcag ggctgccgc cccgacgttg 30  
  
 <210> 37  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos del cebador TINA1H-F  
  
 <400> 37  
 ccagatgggt gctgagccag atccagttgg tgcagtctgg acctgag 47  
  
 <210> 38  
 <211> 48  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos del cebador TINA1H-R  
  
 <400> 38  
 45 ctggtggag gctgagctga cggtgaccgc ggtccctgcg cccagac 48  
  
 <210> 39  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

# ES 2 703 903 T3

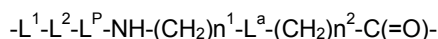
<220>  
 <223> secuencia de nucleótidos del cebador TINA1L-F  
  
 <400> 39  
 atctccggcg cgtacggcga cattgtgatg acccagtctc acaaattc     48  
  
 5     <210> 40  
       <211> 45  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos del cebador TINA1L-R  
  
 <400> 40  
 ggagggggcg gccacagccc gtttcagctc cagcttggtc ccagc     45  
  
 <210> 41  
 <211> 22  
 15     <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos del cebador EG-Inf-F  
  
 <400> 41  
 20     agctcccaga tgggtgctga gc     22  
  
       <210> 42  
       <211> 22  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos del cebador EG1-Inf-R  
  
 <400> 42  
 25     gggcccttgg tggaggctga gc     22  
  
       <210> 43  
 30     <211> 24  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos del cebador CM-LKF  
  
 <400> 43  
 35     ctgtgatct cggcgcgta cggc     24  
  
       <210> 44  
       <211> 21  
       <212> ADN  
 40     <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos del cebador KCL-Inf-R  
  
 <400> 44  
 45     ggagggggcg gccaccgtac g     21

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de fármaco-anticuerpo en el que un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula:



se conjuga con un anticuerpo anti-TROP2 mediante un enlace tioéter que se forma en un resto de enlace disulfuro presente en una parte de la bisagra del anticuerpo anti-TROP2 mediante un enlazador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



en la que el anticuerpo anti-TROP2 se une al extremo de  $L^1$ , el compuesto antitumoral se une al grupo carbonilo del resto  $-(CH_2)n^2-C(=O)-$  con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como la posición de unión,

en la que

$n^1$  representa un entero de 0 a 6,

$n^2$  representa un entero de 0 a 5,

$L^1$  representa  $-(\text{Succinimid-3-il-N})-(CH_2)n^3-C(=O)-$ ,

en la que  $n^3$  representa un entero de 2 a 8,

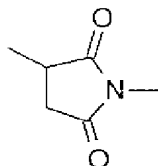
$L^2$  representa  $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$  o un enlace sencillo,

en la que  $n^4$  representa un entero de 1 a 6,

$L^P$  representa un resto tetrapéptido de  $-GGFG-$ ,

$L^a$  representa  $-O-$  o un enlace sencillo, y

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-$  tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



que se une al anticuerpo contra TROP2 en la posición 3 del mismo y se une a un grupo metileno en la estructura del enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1,

en la que el anticuerpo anti-TROP2 comprende CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 en su región variable de la cadena pesada y CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 en su región variable de la cadena ligera.

2. El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con reivindicación 1, en el que el resto de la estructura enlazador-fármaco que tiene un fármaco unido a  $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$  es una estructura de enlazador fármaco seleccionada entre el siguiente grupo:

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-D X),$

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(N H-DX),$

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2C H_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-C H_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2 -C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2 -C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$

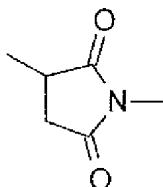


(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), y

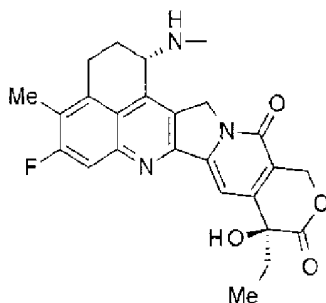
5 -(Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX);

en el que -(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



que se une al anticuerpo anti-TROP2 en la posición 3 del mismo y se une a un grupo metileno en la estructura del enlazador que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1,

10 - (NH-DX) representa un grupo representado por la siguiente fórmula:



en el que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 está en una posición de unión, y

- GGFG- representa un resto tetrapéptido de -Gly-Gly-Phe-Gly-.

15 3. El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con reivindicación 2, en el que el resto de la estructura de enlazador-fármaco es una estructura de enlazador fármaco seleccionada entre el siguiente grupo:

-(Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), y

-(Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

20 4. El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con reivindicación 3, en el que el resto de la estructura de enlazador-fármaco es:

-(Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

5. El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con reivindicación 3, en el que el resto de la estructura de enlazador-fármaco es:

25 -(Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

6. El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con reivindicación 3, en el que el resto de la estructura de enlazador-fármaco es:

-(Succinimid-3-il-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

30 7. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo anti-TROP2 comprende una cadena pesada y una cadena ligera seleccionada entre el grupo;

una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 140 de la SEQ ID NO: 12 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 129 de la SEQ ID NO:18,

35 una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición 20 a 140 de la SEQ ID NO: 14 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 129 de la SEQ ID NO:18,

- una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones de 20 a 140 de la SEQ ID NO: 14 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 129 de la SEQ ID NO:20, y
- 5 una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 140 de la SEQ ID NO: 16 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 129 de la SEQ ID NO:22.
8. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo anti-TROP2 comprende una cadena pesada y una cadena ligera seleccionada entre el grupo;
- 10 una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 470 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 de la SEQ ID NO: 18, una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 470 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 de la SEQ ID NO: 18, una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 470 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 de la SEQ ID NO: 20, y
- 15 una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 470 de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 de la SEQ ID NO: 22.
9. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo anti-TROP2 comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 140 de la SEQ ID NO: 12 y una región variable de la cadena ligera que consiste
- 20 en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 129 de la SEQ ID NO: 18.
10. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo anti-TROP2 comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 20 a 470 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 de la SEQ ID NO: 18.
- 25 11. El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con reivindicación 8, en el que el anticuerpo anti-TROP2 carece de un resto de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada.
12. El conjugado de fármaco anticuerpo de acuerdo con reivindicación 10, en el que el anticuerpo anti-TROP2 carece de un resto de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada.
- 30 13. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que un número promedio de unidades de la estructura de enlazador-fármaco seleccionada conjugada por anticuerpo está en un intervalo de entre 2 a 8.
14. El conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que un número promedio de unidades de la estructura de enlazador fármaco seleccionada conjugada por anticuerpo está en un intervalo de entre 3 a 8.
- 35 15. Un fármaco que contiene el conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, una sal del mismo, o un hidrato del mismo.
16. Un fármaco antitumoral y/o un fármaco anticanceroso que contiene el conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, una sal del mismo, o un hidrato del mismo.
- 40 17. El fármaco antitumoral y/o el fármaco anticanceroso de acuerdo con la reivindicación 16, para su uso en un método de tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de cuello de útero, cáncer de cabeza y cáncer de cuello, o cáncer de esófago.
- 45 18. Una composición farmacéutica que contiene el conjugado de fármaco-anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, una sal del mismo, o un hidrato del mismo como un componente activo, y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.
- 50 19. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 18, para su uso en un método de tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de cuello de útero, cáncer de cabeza y cáncer de cuello, o cáncer de esófago.

FIG.1

**SEQ ID NO 7: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo cTINA1**

atgaaacacctgtggttcttccctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccagatccag  
 ttggtgcagctctggacctgagctgaagaagcctggagagacagtcaggatctcctgcaaggcttct  
 ggtataccttcacaactgctggaatgcagtggtgcaaaagatgccaggaaaggtttgaagtgg  
 attggctggataaacacccactctggagtgcacaaaatgcagaagacttcaagggacggtttgc  
 ttctctttgaaacctctgccagcactgcatatttacagataagcaacctcaaaaatgaggacacg  
 actacgtatttctgtgagatcggggttcggtagtagctactggtacttogatgtctggggcgca  
 gggaccgctgctcaccgtcagctcagcctccaccaagggcccaagcgtctccccctggcaccctcc  
 tccaagagcacctctggcggcacagccgcctgggctgcctggtcaaggactactccccgaacc  
 gtgaccgtgagctggaactcagggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccctgctcctgag  
 tcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaaccagacc  
 tacatctgcaacgtgaatcacaagccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatct  
 tgtgacaaaactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagctctc  
 ctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtg  
 gtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcat  
 aatgccaagacaaagccccgggaggagcagtaaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcacc  
 gtctcgcaccaggactggtgaatggcaaggagtaaacgtgcaaggtctccaacaagccctcca  
 gccccatcgagaaaacctctccaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctg  
 cccccatccccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctat  
 ccagcgcacatcgccgtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccacct  
 ccgctgctggaactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtgg  
 cagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaag  
 agcctctccctgtctcccgcaaa

Secuencia señal (1-57), región variable (58-420), región constante (421-1410)

**SEQ ID NO 8: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo cTINA1**

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQIQLVQSGPELKKPGETVTRISCKASGYTFTTAGMQWVQKMPGKGLKWIWINT  
 HSGVPKYAEDFKGRFAFSLETSASTAYLQISNLKNEDTTTYFCARSGFGSSYWFVWVWAGTAVTVSSASTK  
 GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSL  
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia señal (1-19), región variable (20-140), región constante (141-1470)

FIG.2

**SEQ ID NO 9: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo cTINA1**

atgggtgctgcagaccaggtgttcacatctccctgctgctgtggatctccggcgcgtaacggcgacatt  
gtgatgaccagtcacacaaattcatgtccacatcagtaggagacagggtcagcatcacctgcaag  
gccagtcaggatgtgagtactgctgtagcctggatcaacagaaaccaggacaatctcctaaactg  
ctgatttactcggcatcctaccgctacactggagtcctgatcgcttcaactggcagtgatctggg  
acggctttcacttcaccatcagcagtgctgaggtgaagacctggcagtttattactgtcagcaa  
cattatattactccgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaacgggctgtggccgcc  
ccctcgtgttcacatctccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgctccgtggtgtgc  
ctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtc  
gggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacc  
ctgacctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagaggtgacccaccagggc  
ctgagctccccgctaccaagagcttcaacagggggagtg

Secuencia señal (1-60), región variable (61-387), región constante (388-702)

**SEQ ID NO 10: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo cTINA1**

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS  
YRYTGVPDRFTGSGSGTAFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYITPLTFGAGTKLELKRAVAAPSVEIFPPSDEQ  
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
THQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), región variable (21-129), región constante (130-234)

FIG.3

**SEQ ID NO 11: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-H1**

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagctggtg  
cagctctggcgcgaagtgaagaaaccaggcgcagcgtgaagggtcctgcaaggccagcggctacacctt  
accaccgcccgcagctgagtggtgcccaggctcctggacagggcctggaatggatgggctggatcaacacc  
cacagcggcgtgcccatacgcggaggacttcaagggcagagtgaccatcagcgcgacaccagcacctcc  
acagcctacctgagctgagcagcctgaagtccgaggacaccgcccgtgactactgcccagaagcggcttc  
ggcagcagctactggtacttcgacgtgtggggccaggccaccctcgtgaccgtcagctcagcctccaccaag  
ggcccaagcgtcttcccctggcaccctcctcaagagcacctctggcggcagcagcccctgggctgctg  
gtcaaggactacttcccgaaccgtgaccgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcaacc  
tccccctgctcctgagctcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagctg  
ggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcaagaccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccc  
aaatcttctgacaaaactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagctctc  
ctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggac  
gtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca  
aagccccgggagagcagtaacaagcagctaccgggtggtcagcgtcctcaaccgtcctgaccaggactgg  
ctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc  
aaagccaaagccagcccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggagagatgaccaagaac  
caggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcagatcgccgtggagtgaggagcaatggc  
cagcccagagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctccttctcctctacagcaag  
ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgctctctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcac  
aaccactacaccagaagagcctctcctgtctcccggcaaa

Secuencia señal (1-57), región variable (58-420), región constante (421-1410)

**SEQ ID NO 12: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-H1**

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTTAGMQWVRQAPGQGLENMGWINT  
HSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSFGSSYWFVWVWQGTLLVTSSASTK  
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGLVITFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL  
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD  
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia señal (1-19), región variable (20-140), región constante (141-470)

FIG.4

**SEQ ID NO 13: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-H2**

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagctggtg  
 cagtctggcgccgaagtgaagaaaccaggcgccagcgtgaaggtgctcctgcaaggccagcggctacacctt  
 accaccgcccgcagtgagtggtgcccaggctcctggacagggcctggaatggatggctggatcaacacc  
 cacagcggcgtgcccatacgcgaggacttcaagggcagagtgaccatcagcctggacaccagcacctcc  
 accgcctacctgcagctgagcagcctgaagtcaggagacaccgctgtactactgcccagaagcggcttc  
 ggacagcagctactggtacttcgacgtgtggggccaggccaccctcgtgaccgtcagctcagcctccaccaag  
 ggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcggcacagccgctggcgtgctg  
 gtaaggactacttccccgaaccctgaccgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacc  
 tccccgctgctcagctcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttg  
 ggacccagacctaactctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttagccc  
 aatcttctgtgacaaaactcacacatgccccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagcttc  
 ctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctccgggaccctgaggtcaatgctggtggtggac  
 gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcaatgccaagaca  
 aagccccgggaggagcagtaaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgg  
 ctgaatggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc  
 aaagccaaaggccagccccgggaaccaagggtgacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaac  
 caggtcagcctgacctgctgctcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggc  
 cagcccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctccttctcctctacagcaag  
 ctaccctggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcac  
 aaccactaccccagaagagcctctccctgtctcccgcaaa

Secuencia señal (1-19), región variable (20-140), región constante (141-470)

**SEQ ID NO 14: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-H2**

MKHLWFFLLLVAA PRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTF TTAGMQWVRQAPGQGLEWVGWINT  
 HSGVPKYAE DFKGRVTISLDTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARS GFGSSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL  
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDV  
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia señal (1-57), región variable (58-420), región constante (141-470)

FIG.5

**SEQ ID NO 15: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-H3**

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccagatccagctggtg  
cagtctggcgcgaagtgaagaaacccggcgagagcgtgaaggtgctcctgcaaggccagcggctacacctt  
accaccgcccgcagtgagtggtgcagcagatgcctggcaagggcctggaatggatgggctggatcaacacc  
cacagcggcgtgccaaaatcgccgaggacttcaagggcagagtgacctcagcctggacaccagcacctcc  
accgctacctgagctgagcagcctgaagtccgaggacaccgctgtactactgcccagaagcggcttc  
ggcagcagctactggtacttcgacgtgtggggccagggcaccctcgtgaccgtcagctcagcctccaccaag  
ggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcggcacagccgctgggctgctg  
gtcaaggactacttccccgaacccgtgaccgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacc  
ttccccgctgtcctgagctcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagctg  
ggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcaccaagccagcaaacccaaggtggacaagagagttgagccc  
aaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagctctc  
ctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaacccctgaggtcacatgcgtggtggtggac  
gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgataatgccaagaca  
aagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcacgctcctgaccagactgg  
ctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc  
aaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaac  
caggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggc  
cagccccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaag  
ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggtctgcaac  
aaccactacaccagaagagcctctccctgtctcccggcaaa

Secuencia señal (1-57), región variable (58-420), región constante (421-1410)

**SEQ ID NO 16: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-H3**

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQIQLVQSGAEVKKPGESVKVSKKASGYTFTTAGMQWVQQMPGKGLEWGWINT  
HSGVPKYAEDFKGRVTFSLDTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYWFVWVGQGLVTVSSASTK  
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSL  
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPELLEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD  
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQOGNLFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia señal (1-19), región variable (20-140), región constante (141-470)

FIG.6

**SEQ ID NO 17: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-L1**

```
atggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcggtacggcgacatccagatg
accagagccctagcagcctgagcgcgacgctggggcgacagagtacatcacaatgcaagccagccaggac
gtgtccacagccgtggcctggatcagcagaagcctggcaaggcccccaagctgctgatctacagcgcagc
taccggtaacccggcgtgccagcagattttctggcagcggctccggcaccgacttcacctgacaatcagc
agcctgcagcccaggacttcgccgtgtactactgccagcagcactacatcacccccctgaccttggccag
ggaccaagctggaaatcaagcgtacgggtggccgccccctccgtgttcatcttccccctccgacgagcag
ctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgg
aaggtggacaacgccctgcagtcgggaaactcccaggagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacc
tacagcctgagcagcaccctgacctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtg
accaccagggcctgagctccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtgt
```

Secuencia señal (1-60), región variable (61-387), región constante (388-702)

**SEQ ID NO 18: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-L1**

```
MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSAS
YRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC
```

Secuencia señal (1-20), región variable (21-129), región constante (130-234)



FIG.7

**SEQ ID NO 19: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-L2**

atggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcgtacggcgacatcgtgatg  
accagagccctagcagcctgagcgcagcgtggcgacagagtgaccatcacatgcaaggccagccaggac  
gtgtccacagccgtggcctggatcagcagaagcctggcaaggcccccaagctgctgatctacagcgcagc  
taccggtacaccggcgtgccagcagattttctggcagcggctccggcaccgacttcaccctgacaatcagc  
agcctgcagcccaggacttcgccgtgtactactgccagcagcactacatcacccccctgaccttggccag  
ggcaccaagctggaaatcaagcgtacggtggcgcgcccccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcag  
ctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgg  
aaggtggacaacgccctgcagtcgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacc  
tacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgctgcgaggtg  
accaccaggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtg

Secuencia señal (1-60), región variable (61-387), región constante (388-702)

**SEQ ID NO 20: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-L2**

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS  
YRYTGVPSTRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
THQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), región variable (21-129), región constante (130-234)

FIG.8

**SEQ ID NO 21: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-L3**

atggtgctgcagaccaggtgttcattcctcctgctgctgtggatctccggcgcgtacggcgacatcgtgatg  
accagagccctagcagcctgagcgcagcgtggcgacagagtgaccatcacatgcaaggccagccaggac  
gtgtccacagccgtggcctggtatcagcagaagcccggcaagcagcccaagctgctgatctacagcgcagc  
taccggtacaccggcgtgcccagcagattttctggcagcggctccggcaccgacttcacctgacaatcagc  
agcctgcagcccagaggacttcgcccgtgtactactgcccagcagcactacatcacccccctgaccttggccag  
ggaccaagctggaaatcaagcgtacggtggcggccccctccgtgttcattccccccctccgacgagcag  
ctgaagtcggcaccgctccgtggtgtgctgctgaataacttctacccagagaggccaaggtgcagtgg  
aaggtggacaacgccctgcagtcgggaaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacc  
tacagcctgagcagcaccctgacctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgctgagagggtg  
accacccagggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggaggtg

Secuencia señal (1-60), región variable (61-387), región constante (388-702)

**SEQ ID NO 22: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-L3**

MVLQTVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPSSLSASVGDVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKQPKLLIYSAS  
YRYTGVPSRFRSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV  
THQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), región variable (21-129), región constante (130-234)

**FIG.9**

SEQ ID NO 23: Secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo TINA1

TAGMQ

SEQ ID NO 24: Secuencia de aminoácidos de CDRH2 del anticuerpo TINA1

WINTHSGVPKYAEDFKG

SEQ ID NO 25: Secuencia de aminoácidos de CDRH3 del anticuerpo TINA1

SGFGSSYWYFDV

SEQ ID NO 26: Secuencia de aminoácidos de CDRL1 del anticuerpo TINA1

KASQDVSTAVA

SEQ ID NO 27: Secuencia de aminoácidos de CDRL2 del anticuerpo TINA1

SASYRYT

SEQ ID NO 28: Secuencia de aminoácidos de CDRL3 del anticuerpo TINA1

QQHYITPLT

FIG.10

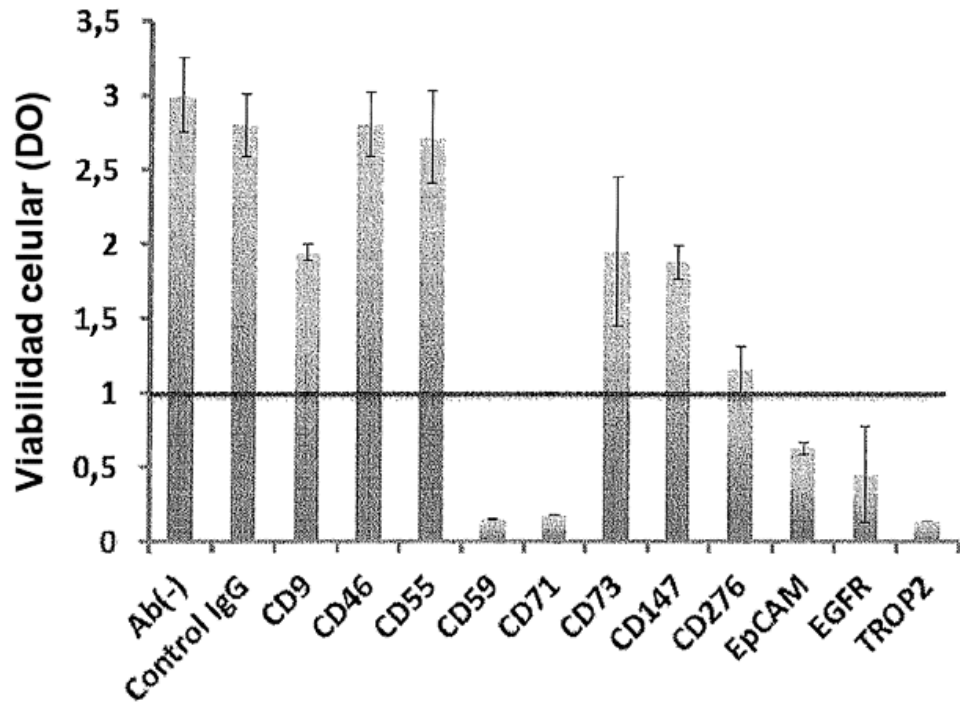


FIG.11

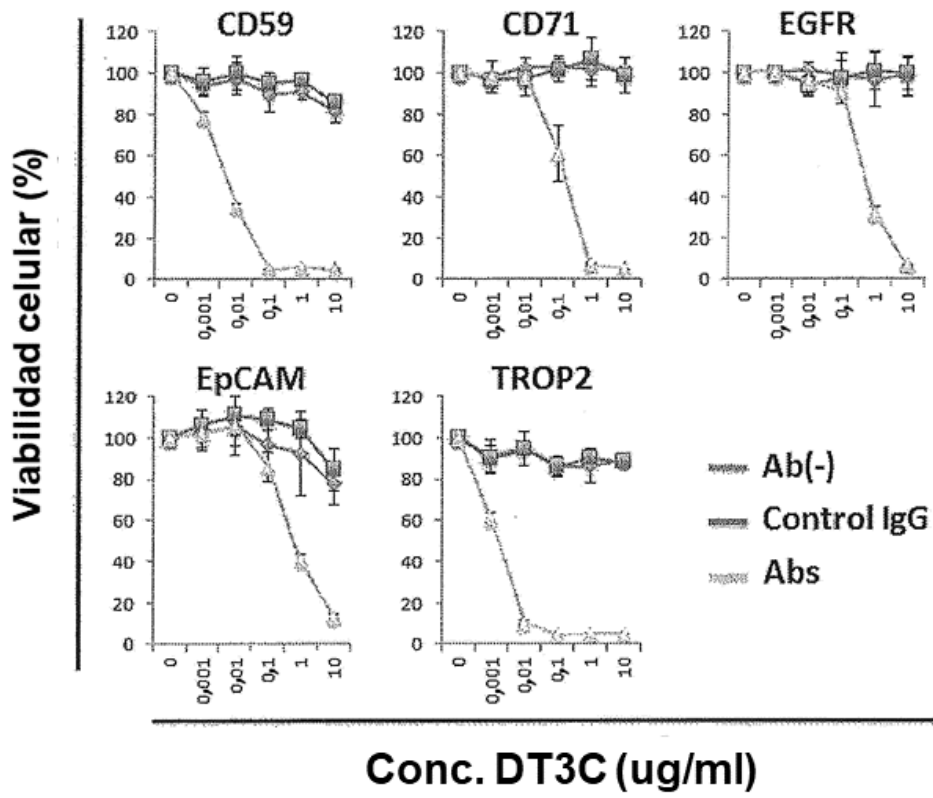


FIG. 12

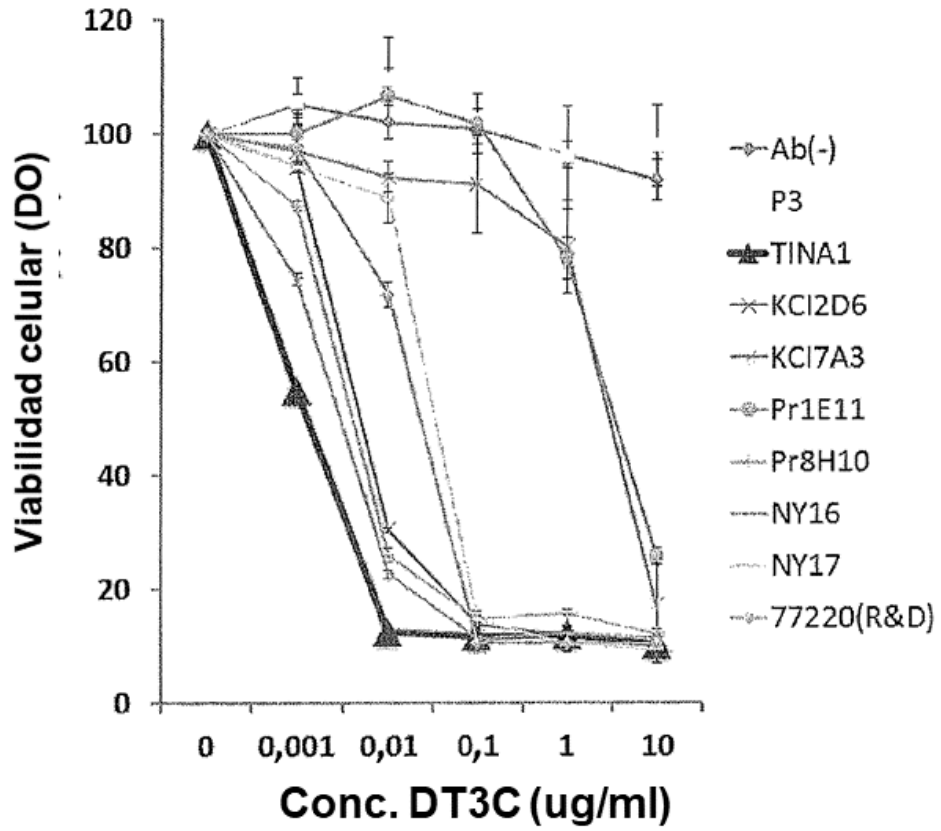


FIG. 13

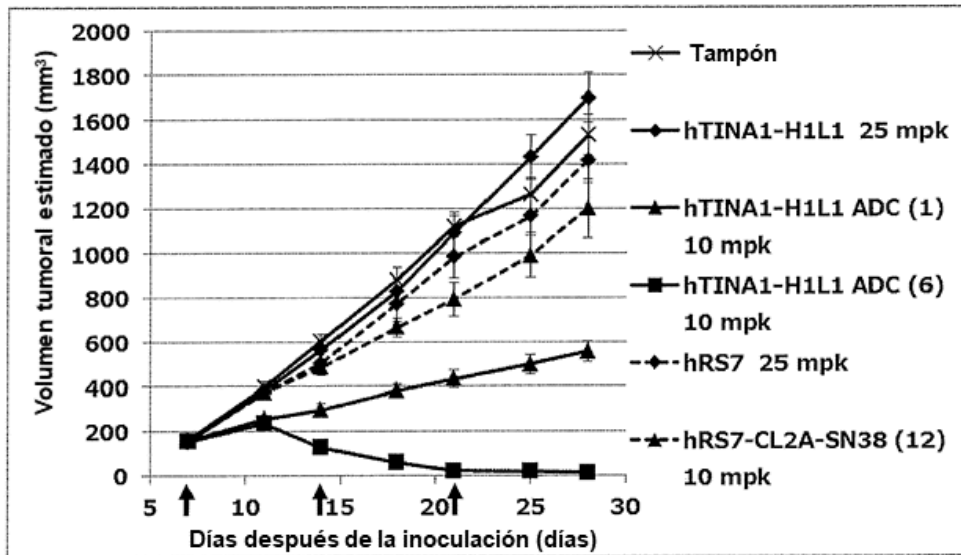


FIG.14

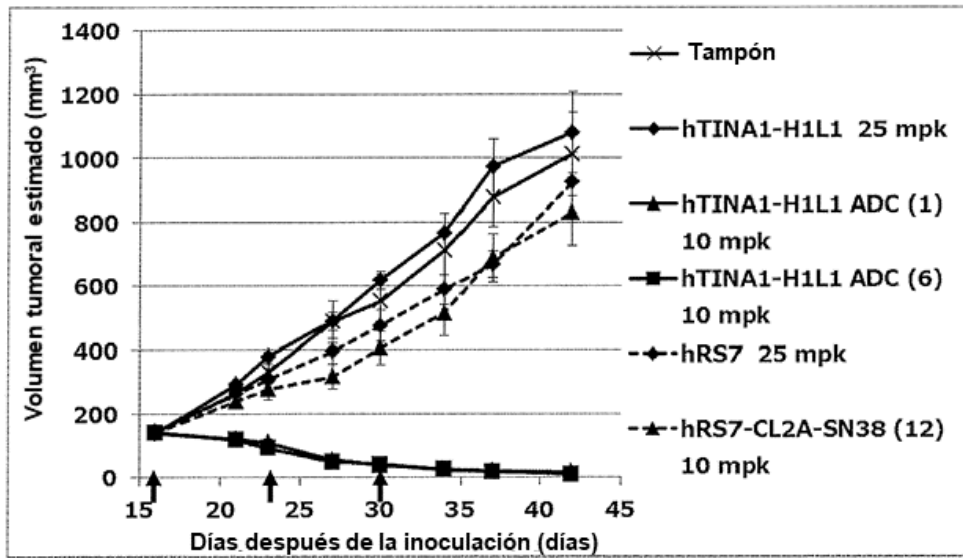




FIG.15

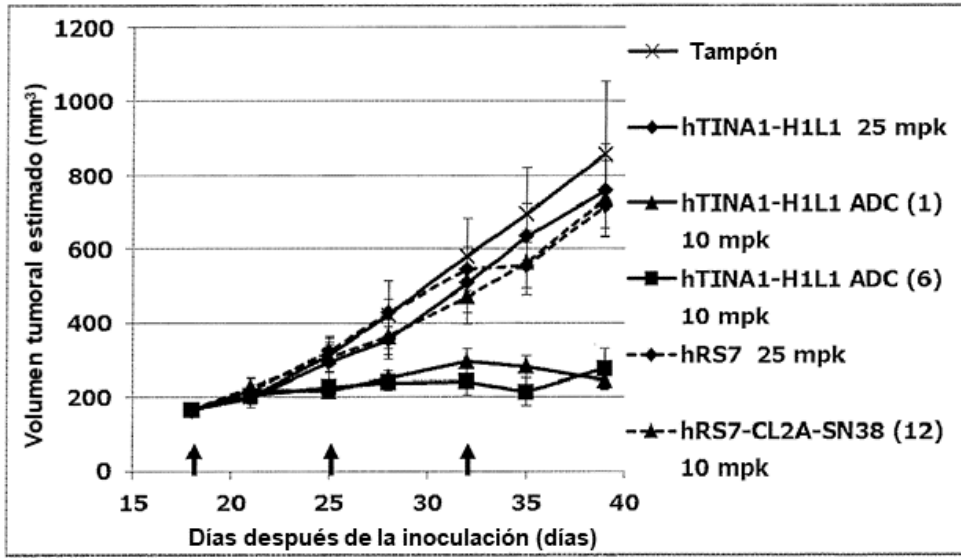


FIG.16

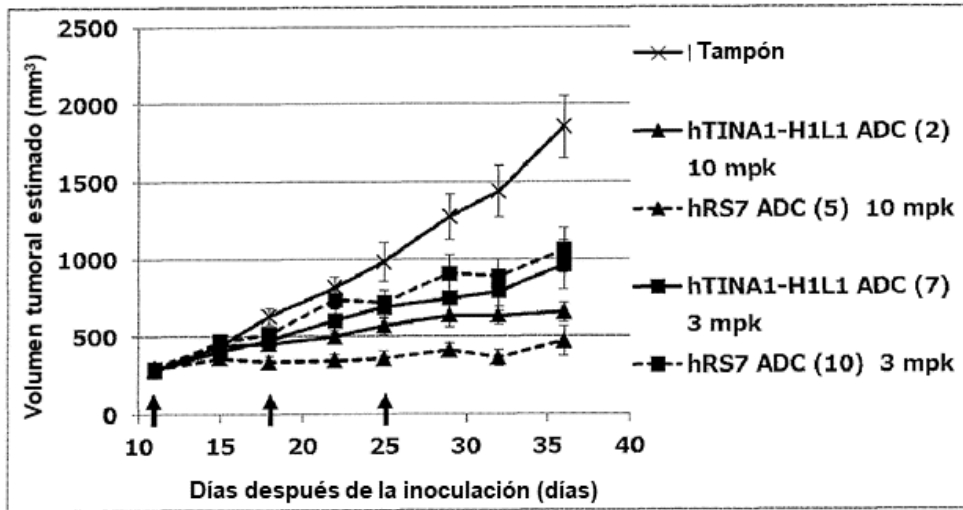


FIG.17

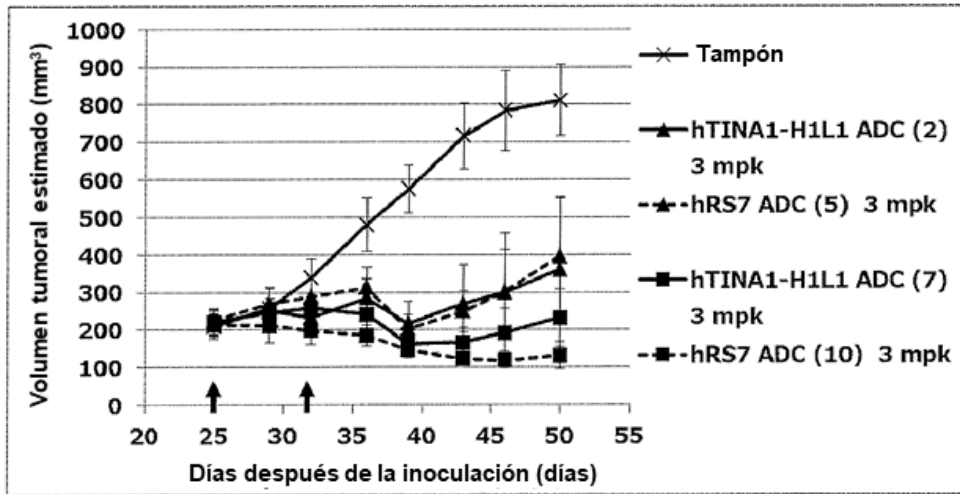


FIG.18

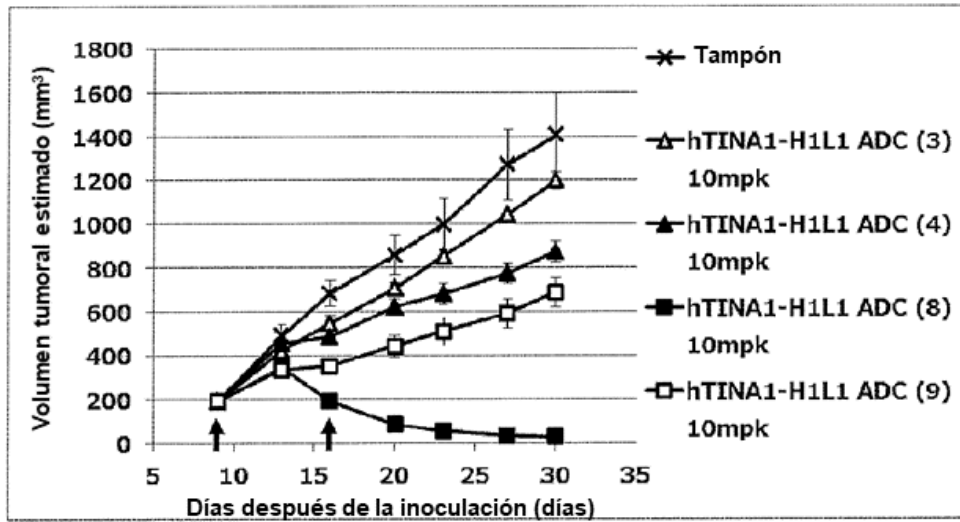


FIG.19

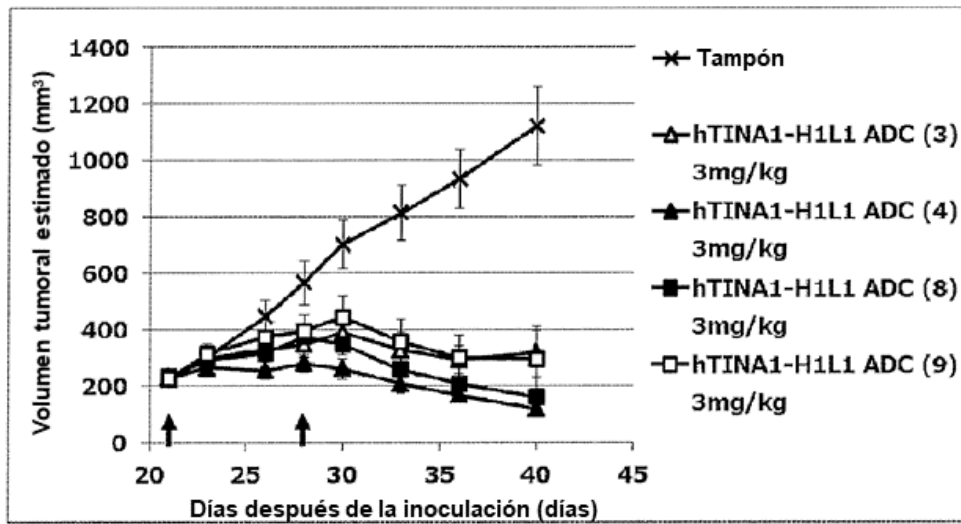


FIG.20

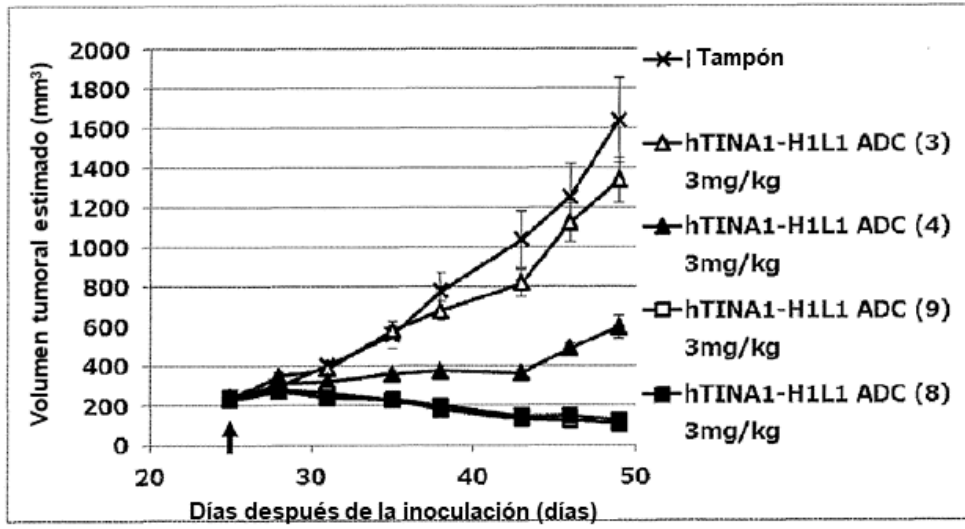


FIG.21

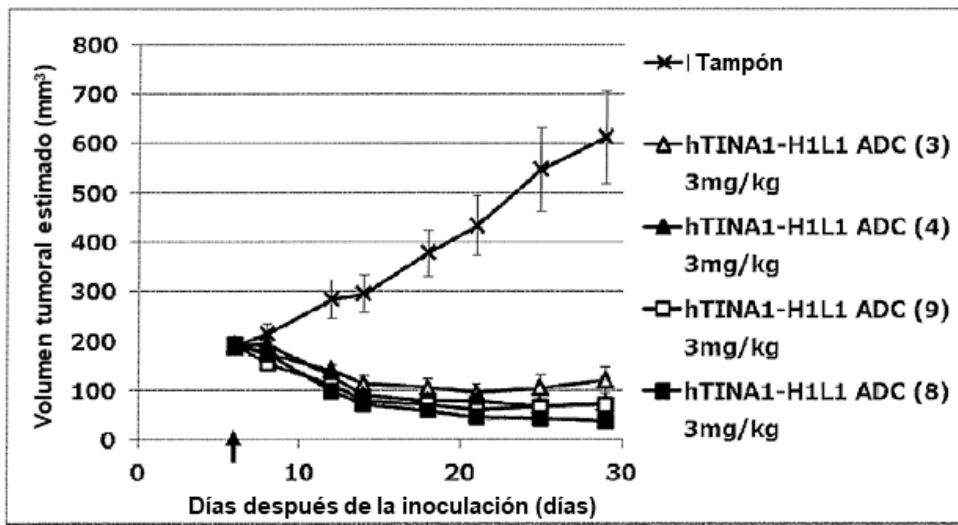


FIG.22

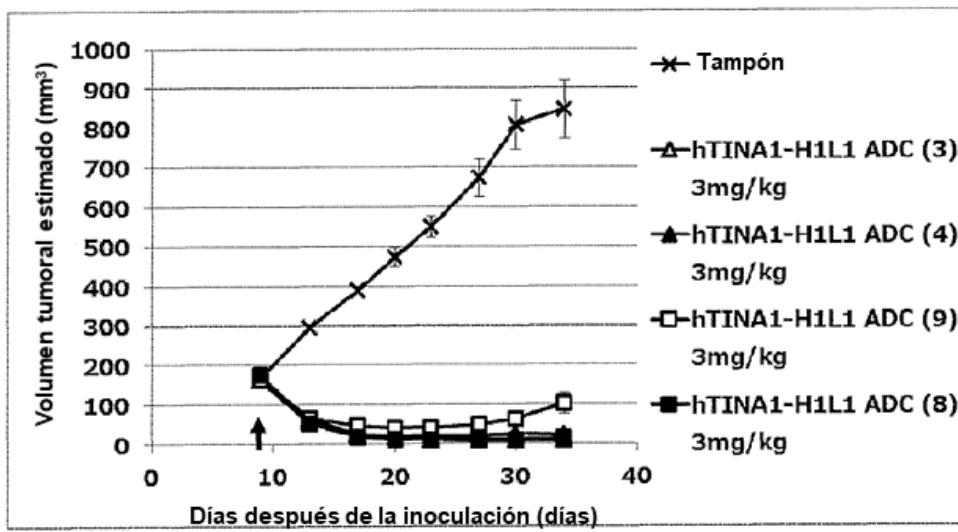




FIG.23

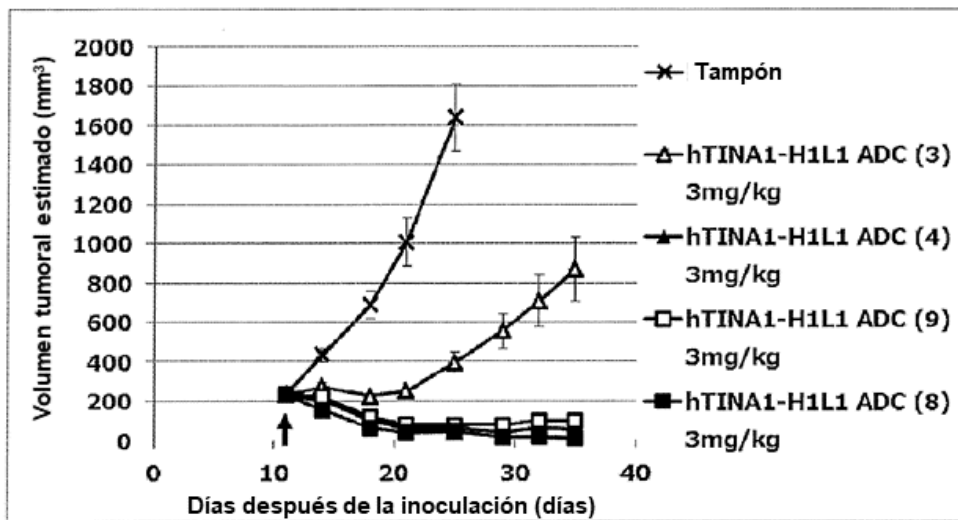


FIG.24

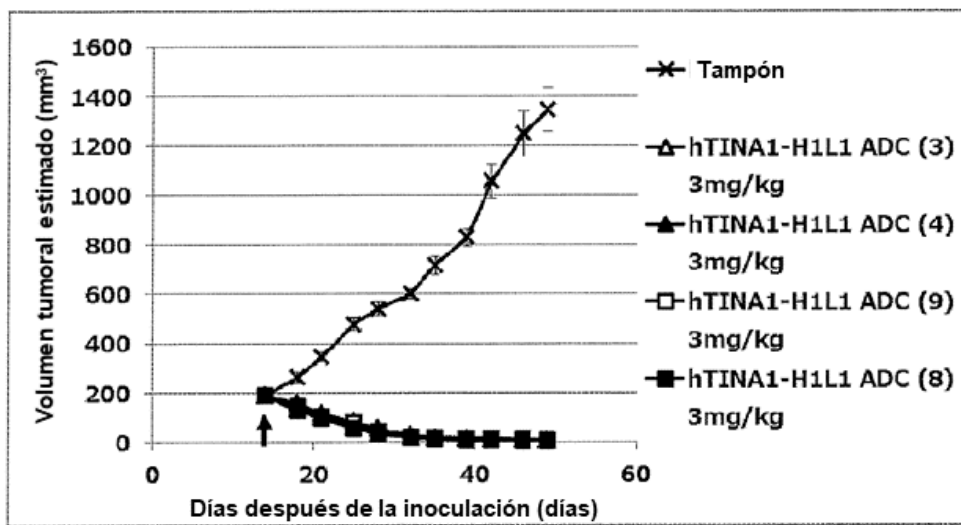


FIG.25

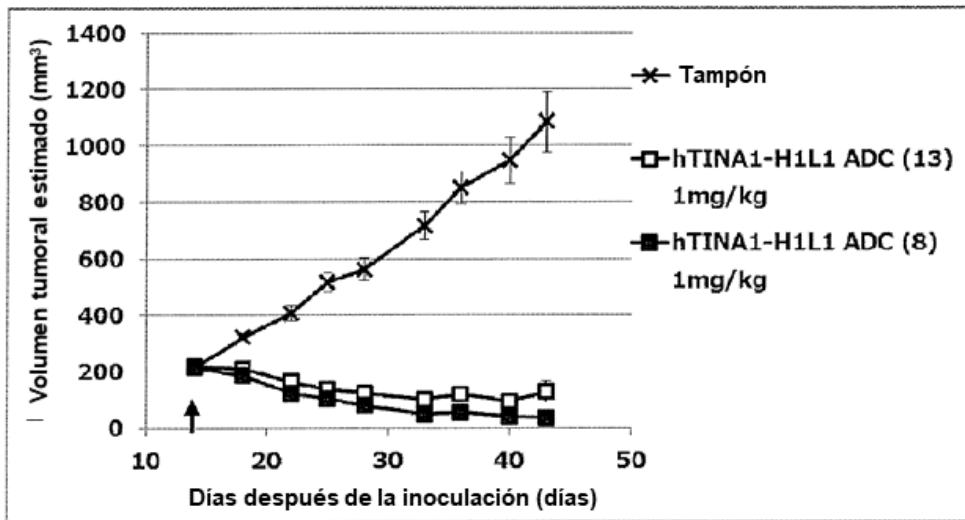


FIG.26

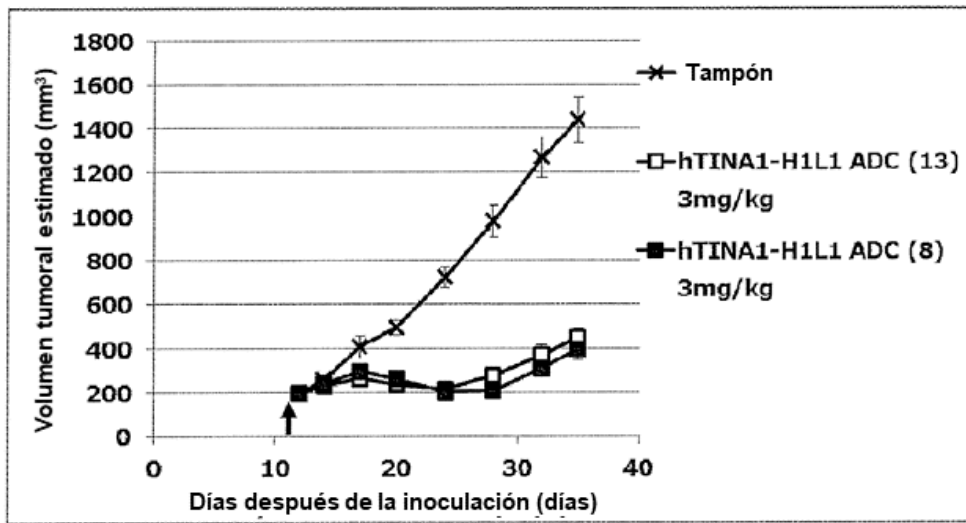


FIG. 27

