(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 927 090**

(51) Int. CI.:

C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61P 35/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2012 E 18203986 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2022 EP 3521313**

(54) Título: **Anticuerpo anti-TROP-2 humano que muestra actividad antitumoral *in vivo***

(30) Prioridad:

22.11.2011 US 201161562672 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2022

(73) Titular/es:

CHIOME BIOSCIENCE INC. (100.0%)
3-12-1 Honmachi, Shibuya-ku
Tokyo 151-0071, JP

(72) Inventor/es:

NAKAMURA, KOJI;
OKAMURA, KENTARO;
TAMURA, MAKI;
YANAI, HIROYUKI;
KANKE, TORU;
TSURUSHITA, NAOYA y
KUMAR, SHANKAR

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

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

DESCRIPCIÓN

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

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

El TROP-2 humano (Tacstd2, GA733-1 y EGP-1) (también denominado en lo sucesivo en el presente documento "hTROP-2") es una proteína de membrana celular de tipo 1, de un solo dominio transmembrana, que consta de 323 restos de aminoácidos (véase la SEQ ID NO: 2), y se sabe que esta proteína se sobreexpresa en diversos tipos de carcinomas de células epidérmicas. La presencia de una proteína de membrana celular asociada con resistencia inmunológica, que se expresa habitualmente tanto en trofoblastos humanos como en células cancerosas, se ha sugerido durante mucho tiempo (documento no de patente 1). Se ha identificado una molécula antigénica reconocida por anticuerpos monoclonales de ratón (162-25.3, 162-46.2) que reacciona con la proteína de membrana celular de una línea celular de coriocarcinoma humano BeWo. Esta molécula de antígeno se consideró una de las moléculas expresadas en trofoblastos humanos y se denominó Trop-2 (documento no de patente 2). Posteriormente, la misma molécula fue descubierta por otros investigadores. Es decir, un antígeno tumoral reconocido por un anticuerpo monoclonal de ratón GA733 que se obtiene mediante inmunización con células de cáncer de estómago SW948 se denominó GA733-1 (documento no de patente 3) y una glucoproteína epitelial reconocida por un anticuerpo monoclonal de ratón RS7-3G11 que se obtiene por inmunización con células de cáncer de pulmón no microcítico se denominó antígeno epitelial/de carcinoma, EGP-1 (documento no de patente 4). En 1995, se clonó el gen Trop-2 y, como resultado, se confirmó que estas son las mismas moléculas (documento no de patente 5). Por otra parte, se aclaró que la molécula tiene una función para amplificar las señales de calcio intracelular en células cancerosas (documento no de patente 6) y, por lo tanto, también se denomina transductor de señal de calcio asociado a tumor 2 (TACSTD2).

El gen hTROP-2 se mapea en el cromosoma 1p32 y constituye una familia de genes TACSTD junto con GA733-2 que tiene una homología de aproximadamente 50 % (que se conoce como "TACSTD1", "glucoproteína epitelial EGP-2", "EpCAM" o "Trop-1") (documento no de patente 7). La proteína hTROP-2 (323 restos de aminoácidos; SEQ ID NO: 2) tiene un peso molecular de aproximadamente 36 kilodalton y esta proteína consiste en un péptido señal hidrófilo (aminoácidos 1 a 26), un dominio extracelular (aminoácidos 27 a 274), un dominio transmembrana (aminoácidos 275 a 297) y un dominio intracelular (aminoácidos 298 a 323). El dominio extracelular tiene cuatro sitios de glucosilación con enlaces N heterogéneos y su peso molecular aparente aumenta en 11 a 13 kilodalton debido a la adición de cadenas de azúcar (documento no de patente 5). Se considera que la familia de genes TACSTD tiene una secuencia característica de tiroglobulina (TY) en el dominio extracelular y está asociada con la proliferación, invasión y metástasis de células cancerosas.

Hasta la fecha, no se ha identificado ningún ligando fisiológico de hTROP-2 y su función molecular no se ha aclarado. Sin embargo, se ha descrito que hTROP-2 transmite una señal de calcio en células tumorales (documento no de patente 6). Además, a partir de los hechos de que la serina 303 intracelular es fosforilada por la proteína quinasa C (PKC) que es quinasa dependiente de Ca^{2+} (documento no de patente 4) y que hTROP-2 tiene una secuencia de unión a PIP2 en su dominio intracelular, se ha sugerido que hTROP-2 tiene una función de señalización en células tumorales (documento no de patente 8).

Como resultado de análisis tales como inmunohistoquímica (IHC) y citometría de flujo, se ha señalado la sobreexpresión de hTROP-2 en muchos tipos de carcinomas derivados del epitelio tales como cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de hígado y cáncer de esófago. Por el contrario, la expresión de hTROP-2 en tejidos normales está limitada a células en la región epitelial y el nivel de expresión de hTROP-2 en células normales es menor que en células cancerosas. Por tanto, se sugiere la asociación de TROP-2 con la formación de tumores (documentos de patente 1-3 y 9).

Por otra parte, se ha demostrado que la expresión de hTROP-2 usado como biomarcador en muestras clínicas se correlaciona con la malignidad del cáncer colorrectal (documentos no de patente 10 y 11), cáncer pancreático (documento no patente 12) o cáncer oral (documento no de Patente 13), y que cuando se sobreexpresa hTROP-2, la posibilidad de metástasis o reaparición de dicho cáncer es significativamente alta. Asimismo, en un análisis de expresión génica a gran escala usando una técnica de micromatrices de ADNc, hTROP-2 se ha identificado como un grupo de genes, que se sobreexpresa al mayor nivel en adenocarcinoma papilar grave del ovario, en comparación con el epitelio de ovario normal (documento no de patente 14).

Adicionalmente, en los últimos años, se ha demostrado un papel importante de hTROP-2 en la formación de tumores en los modelos mediante el uso de células de cáncer de colon (documento no de patente 15). Ya que la expresión de hTROP-2 promueve la proliferación celular independiente del anclaje de células tumorales y es necesaria para la formación de tumores y la proliferación de células cancerosas trasplantadas por vía subcutánea en ratones inmunodeficientes, planteó la posibilidad de que hTROP-2 actuara como un antígeno tumoral funcional y se usara como una nueva diana terapéutica.

Hasta la fecha, se han señalado estudios acerca de los efectos antitumorales de varios anticuerpos anti-hTROP-2. Se ha examinado un anticuerpo RS7 (documento de patente 1) empleando modelos *in vivo*, en los que se usaron anticuerpos marcados con sustancias radiactivas, y se demostró la actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de ratón desnudo. Sin embargo, no se han indicado los efectos antitumorales por el anticuerpo solo (un anticuerpo desnudo).

Además, se ha indicado la citotoxicidad de un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 unido a citotoxina BR110 (documento de patente 2) en las líneas celulares de cáncer humano H3619, H2987, MCF-7, H3396 y H2981 en experimentos *in vitro*. Sin embargo, no se ha desvelado la citotoxicidad de un anticuerpo desnudo o un inmunoconjugado de BR110 *in vivo*.

En los últimos años, se ha indicado que un anticuerpo monoclonal aislado, que se produjo a partir de una línea celular de hibridoma AR47A6.4.2 o AR52A301.5 obtenida inmunizando ratones con tejidos de cáncer de ovario humano, unido a hTROP-2 y que, por primera vez, presentó, como un anticuerpo desnudo, actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de ratón desnudo, así como citotoxicidad *in vitro* (documentos de patente 3 y 4). En estos documentos de patente, el anticuerpo anteriormente mencionado presentó efectos antitumorales por tratamiento con anticuerpo solo en modelos de xenoinjerto de ratón, en los que se habían trasplantado líneas celulares de cáncer de páncreas BxPC-3 y PL45, una línea celular de cáncer de próstata PC-3, una línea celular de cáncer de mama MCF-7 y una línea celular de cáncer de colon Colo205. Los efectos terapéuticos del anticuerpo han aparecido en los modelos, en los que se habían trasplantado células BxPC-3. Aparte de esto, la formación y proliferación de tumores fueron suprimidas solo parcialmente (aproximadamente de 40 % a 60 %) por la administración preventiva del anticuerpo y fue necesaria una cantidad extremadamente grande (aproximadamente 20 mg/kg) del anticuerpo para dicha supresión de la formación y proliferación de tumores.

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

El Documento de patente 3 desvela un método para producir anticuerpos modificadores de la enfermedad cancerosa. Se desvela la actividad antitumoral *in vivo* del anticuerpo anti-TROP-2 AR46A6.4.2.

El Documento de patente 4 desvela un método para producir anticuerpos modificadores de la enfermedad cancerosa. Se desvela la actividad antitumoral *in vivo* del anticuerpo anti-TROP-2 AR52A301.5.

El Documento no de patente 16 desvela que los carcinomas de cuello de útero sobreexpresan el marcador de superficie celular de trofoblasto humano (Trop-2) y son altamente sensibles a inmunoterapia con hRS7, un anticuerpo anti-Trop-2 monoclonal humanizado.

El Documento no de patente 17 desvela estudios preclínicos de un conjugado anti-Trop-2 IgG-SN-38 humanizado en modelos de xenoinjerto de cáncer humano y monos.

Documento de patente 1: patente de los Estados Unidos n.º 6653104
Documento de patente 2: patente de los Estados Unidos n.º 5840854
Documento de patente 3: patente de los Estados Unidos n.º 7420040
Documento de patente 4: patente de los Estados Unidos n.º 7420041
Documento no de patente 1: Faulk WP, *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75(4), págs. 1947-1951 (1978)
Documento no de patente 2: Lipinski M, *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78(8), págs. 5147-5150 (1981)
Documento no de patente 3: Linnenbach AJ, *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86(1), págs. 27-31 (1989)
Documento no de patente 4: Basu A, *et al*., Int. J. Cancer, 62(4), págs. 472-479 (1995)
Documento no de patente 5: Fornaro M, *et al*., Int. J. Cancer, 62(5), págs. 610-618 (1995)
Documento no de patente 6: Ripani E, *et al*., Int. J. Cancer, 76(5), págs. 671-676 (1998)
Documento no de patente 7: Calabrese G, *et al*., Cell Genet., 92(1-2), págs. 164-165 (2001)
Documento no de patente 8: El Sewedy T *et al*., Int. J. Cancer, 75(2), págs. 324-330 (1998)
Documento no de patente 9: Cubas R, *et al*., Biochim. Biophys. Acta., 1796(2), págs. 309-314 (2009)
Documento no de patente 10: Ohmachi T *et al*., Clin. Cancer Res., 12(10), págs. 3057-3063 (2006)
Documento no de patente 11: Fang YJ, *et al*., Int. J. Colorectal Dis., 24(8), págs. 875-884 (2009)
Documento no de patente 12: Fong D, *et al*., Br. J. Cancer, 99(8), págs. 1290-1295 (2008)

Documento no de patente 13: Fong D, *et al*., Mod. Pathol., 21(2), págs. 186-191 (2008)
Documento no de patente 14: Santin AD, *et al*., Int. J. Cancer, 112(1), págs. 14-25 (2004)
Documento no de patente 15: Wang J, *et al*., Mol. Cancer Ther., 7(2), págs. 280-285 (2008)
Documento no de patente 16: Varughese, J, et al., American Journal of Obstetrics and Gynecology 205.6 (2011): 567-e1
Documento no de patente 17: Cardillo, T, et al., Clinical Cancer Research 17: 3157-3169 (2011)

Sumario de la invención

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

Se ha completado la presente invención, teniendo en cuenta las circunstancias mencionadas anteriormente. La presente invención proporciona un anticuerpo anti-hTROP-2 (un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2), un hibridoma, que produce el anticuerpo, un fragmento del anticuerpo, un conjugado (un inmunoconjugado) del anticuerpo o similares y un fármaco, una composición farmacéutica para diagnosticar o tratar un tumor, un método para detectar un tumor, un kit para detectar o diagnosticar un tumor y similares, que se describirán a continuación. (1) Un anticuerpo contra TROP-2 humano en el que una región V de cadena H del anticuerpo consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 92 o 98 y una región V de cadena L del anticuerpo consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 93.

En el anticuerpo según (1) anterior, las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de cadena H del anticuerpo se muestran en la SEQ ID NO: 36 a 38, respectivamente, y/o las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de cadena L del anticuerpo se muestran en las SEQ ID NO: 41 a 43, respectivamente.

Un ejemplo del anticuerpo según (1) anterior es un anticuerpo humanizado.

Un ejemplo del anticuerpo según (1) anterior es un anticuerpo que tiene actividad antitumoral *in vivo.*

Un ejemplo del anticuerpo según (1) anterior es un anticuerpo que presenta 50 % o más de actividad inhibidora del crecimiento tumoral a una dosis de 5 a 20 mg/kg de peso corporal. En el presente documento, la frecuencia de administración para presentar la actividad inhibidora del crecimiento tumoral es, por ejemplo, como máximo una vez por semana.

Un ejemplo del anticuerpo según (1) anterior es un anticuerpo que presenta 50 % o más de la actividad inhibidora del crecimiento tumoral mediante una única administración del anticuerpo a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal.

Un ejemplo del anticuerpo según (1) anterior es un anticuerpo que tiene actividad antitumoral en dos o más tipos de líneas celulares tumorales humanas.

Un ejemplo del anticuerpo según (1) anterior es un anticuerpo que tiene una constante de disociación (valor Kd) de $1{,}0 \times 10^{-10}$ M o menos.

Un ejemplo del anticuerpo según (1) anterior es un anticuerpo monoclonal.

En el presente documento, el tumor es al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer de próstata humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de ovario humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de conducto biliar humano. El tumor es preferentemente al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de ovario humano.

Además, el tumor es, por ejemplo, un cáncer recidivante o un cáncer metastásico.

Por otra parte, las líneas celulares tumorales son, por ejemplo, al menos dos tipos seleccionados del grupo que consiste en una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59, una línea celular de cáncer de páncreas humano BxPC-3, una línea celular de cáncer de páncreas humano KP-3L, una línea celular de cáncer de páncreas humano KP-2, una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-1, una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-45H, una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-45P, una línea celular de cáncer de páncreas humano TCC-PAN2, una línea celular de cáncer de páncreas humano SUIT-2, una línea celular de cáncer de colon humano CACO-2, una línea celular de cáncer de colon humano SW480, una línea celular de cáncer de colon humano DLD-1, una línea celular de cáncer de colon humano HCT 116, una línea celular de cáncer de mama humano JIMT-1, una línea celular de cáncer de mama humano HCC1143, una línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, una línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468, una línea celular de cáncer de próstata humano DU145, una línea celular

de cáncer de próstata humano PC-3, una línea celular de cáncer de pulmón humano Calu-3, una línea celular de cáncer de ovario humano SK-OV-3 y una línea celular de cáncer de conducto biliar humano TFK-1. Entre otros, las líneas celulares tumorales son preferentemente al menos dos tipos seleccionados del grupo que consiste en una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59, una línea celular de cáncer de páncreas humano BxPC-3, una línea celular de cáncer de colon humano SW480, una línea celular de cáncer de pulmón humano Calu-3, una línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 y una línea celular de cáncer de ovario humano SK-OV-3.

(2) Un fragmento de anticuerpo procedente del anticuerpo según (1) anterior que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 92 o 98 y/o la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 93.

(3) Un conjugado de anticuerpo-fármaco, que comprende el anticuerpo según (1) anterior y una sustancia que tiene actividad antitumoral y/o actividad destructora de células.

(4) Un conjugado de fragmento de anticuerpo-fármaco, que comprende el fragmento de anticuerpo según (2) anterior y una sustancia que tiene actividad antitumoral y/o actividad destructora de células.

En el conjugado según (3) y (4) anteriores, el tumor es, por ejemplo, al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer de próstata humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de ovario humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de conducto biliar humano. Entre otros, el tumor es preferentemente al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de ovario humano. Por otra parte, el tumor es, por ejemplo, un cáncer recidivante o un cáncer metastásico.

(5) Una composición farmacéutica, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo según (1) anterior, el fragmento de anticuerpo según (2) anterior y el conjugado según (3) y (4) anterior.

Los ejemplos de la composición según (5) anterior incluyen una composición que es para su uso en el tratamiento de tumores, una composición que no provoca reducción de peso como efecto secundario y una composición que es para su uso en el diagnóstico de tumores. En el presente documento, el tumor es, por ejemplo, al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer de próstata humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de ovario humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de conducto biliar humano. Entre otros, el tumor es preferentemente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de ovario humano. Por otra parte, el tumor es, por ejemplo, un cáncer recidivante o un cáncer metastásico

(6) Un agente terapéutico tumoral, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo según (1) anterior, el fragmento de anticuerpo según (2) anterior y el conjugado según (3) y (4) anterior.

Un ejemplo del agente terapéutico tumoral según (6) anterior es un agente terapéutico tumoral que no provoca reducción de peso como efecto secundario. En el presente documento, el tumor es, por ejemplo, al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer de próstata humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de ovario humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de conducto biliar humano. Entre otros, el tumor es preferentemente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de ovario humano.

(7) Un agente de diagnóstico tumoral, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo según (1) anterior, el fragmento de anticuerpo según (2) anterior y el conjugado según (3) y (4) anterior.

En el agente de diagnóstico tumoral según (7) anterior, el tumor es, por ejemplo, al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer de próstata humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de ovario humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de conducto biliar humano. Entre otros, el tumor es preferentemente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de ovario humano.

(8) Un método para detectar un tumor, que comprende: permitir que al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo según (1) anterior, el fragmento de anticuerpo según (2) anterior y el conjugado según (3) y (4) anterior, reaccione con una muestra recogida de un cuerpo vivo; y después detectar una señal o señales del anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo que ha reaccionado.

En el método para detectar un tumor según (8) anterior, el tumor es, por ejemplo, al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer de próstata humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de ovario humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de conducto biliar humano. Entre otros, el tumor es preferentemente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de ovario humano.

(9) Un kit para tratar, diagnosticar o detectar un tumor, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo según (1) anterior, el fragmento de anticuerpo según (2) anterior y el conjugado según (3) y (4) anterior.

En el kit para tratar, diagnosticar o detectar un tumor según (9) anterior, el tumor es, por ejemplo, al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer de próstata humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de ovario humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de conducto biliar humano. Entre otros, el tumor es preferentemente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de ovario humano.

(10) Un polinucleótido que codifica el anticuerpo según (1) anterior.

(11) Un polinucleótido que codifica el fragmento de anticuerpo según (2) anterior.

(12) Un vector recombinante que comprende el polinucleótido según (10) u (11) anterior.

(13) Un transformante que comprende el vector recombinante según (12) anterior.

Breve descripción de los dibujos

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

La Figura 2 muestra la reactividad de un sobrenadante de cultivo de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2, con células HuH-7 (hTROP-2-negativas) y células HuH-7-hTROP-2. El histograma lleno indica células HuH-7 y el histograma vacío indica células HuH-7-hTROP-2.

La Figura 3 muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 con una línea celular de cáncer de páncreas humano (células PK-59), que expresa de manera endógena hTROP-2 en la superficie celular. El histograma lleno indica la reacción de la línea celular solo con un anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón marcado con PE) y el histograma vacío indica la reacción de la línea celular con cada anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2.

La Figura 4 muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 con una línea celular de cáncer de páncreas humano (células BxPC-3), que expresa de manera endógena hTROP-2 en la superficie celular. El histograma lleno indica la reacción de la línea celular solo con un anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón marcado con PE) y el histograma vacío indica la reacción de la línea celular con cada anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2.

La Figura 5 muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (K5-70) con líneas celulares de cáncer de páncreas humano. El histograma lleno indica la reacción de la línea celular solo con un anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón marcado con PE) y el histograma vacío indica la reacción de la línea celular con cada anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2.

La Figura 6 muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (K5-70) con líneas celulares de cáncer de colon humano (Colo320, CACO2, SW480, DLD1, CW2 y HCT 116), líneas celulares de cáncer de mama humano (JIMT-1 y HCC1143) y líneas celulares de cáncer de próstata humano (PC-3 y DU145). El histograma lleno indica la reacción de la línea celular solo con un anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón marcado con PE) y el histograma vacío indica la reacción de la línea celular con el anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2.

La Figura 7 muestra la reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 con TROP-2 de ratón. Se usaron células preparadas permitiendo que un gen de TROP-2 de ratón se expresara de forma transitoria en células CHO-K1 y se usó un anticuerpo T2-102 (IgG1 de ratón) que presentaba reactividad cruzada con TROP-2 de ratón como anticuerpo de control positivo. El histograma lleno indica la reacción de las células solo con un anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón marcado con PE) y el histograma vacío indica la reacción de las células con cada anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2.

La Figura 8 muestra la reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 con EpCAM/TROP-1 humano. Se usaron células preparadas permitiendo que un gen de EpCAM/TROP-1 humano se expresara de forma transitoria en células CHO-K1 y se usó un anticuerpo monoclonal anti-EpCAM humano marcado con PE (Becton, Dickinson and Company) como anticuerpo de control positivo. El histograma lleno indica la reacción de las células solo con un anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón marcado con PE) y el histograma vacío indica la reacción de las células con cada anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2.

La Figura 9 muestra la actividad inhibidora del crecimiento celular de anticuerpos anti-hTROP-2 (T6-16, T5-86, K5-70 y K5-107) en una línea celular de cáncer de páncreas humano (células PK-59). mIgG indica un anticuerpo de control (IgG de ratón) e YY01 indica un anticuerpo anti-hTROP-2 disponible en el mercado (Santa Cruz). Columna blanca: 0 µg/ml; columna gris: 0,1 µg/ml; columna negra: 1 µg/ml. El nivel de actividad se expresó como una relación del valor real con respecto al valor obtenido cuando no se había añadido un anticuerpo (0 µg/ml). La barra de error indica una desviación típica. *P < 0,05, **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

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

La Figura 10A muestra ejemplos representativos de fotografías de las regiones de raspado de células PK-59. El

día 0 muestra un ejemplo representativo inmediatamente después del raspado. mIgG (Día 1) muestra una fotografía tomada 1 día (24 horas) después del raspado y posterior adición de un anticuerpo de control (IgG de ratón, 1 µg/ml) al medio. K5-70 (Día 1) muestra una fotografía tomada 1 día (24 horas) después del raspado y posterior adición de un anticuerpo K5-70 (1 µg/ml) al medio. T6-16 (Día 1) muestra una fotografía tomada 1 día (24 horas) después del raspado y posterior adición de un anticuerpo T6-16 (1 µg/ml) al medio. Cada flecha en cada fotografía indica el ancho de una región de raspado.

Figura 10B. El área de una región de raspado se analizó usando software de análisis de imágenes (Scion Image) y, en función del valor obtenido, se calculó el valor de cada anticuerpo de ensayo usando el valor obtenido el día 0 del grupo de adición de anticuerpo de control (mIgG) como un valor convencional de 1.

*P < 0,05, **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 11 es una vista que ilustra FACS que muestra la expresión de un marcador de células madre en una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59. La Figura 11A es una vista que ilustra FACS que muestra la expresión de EpCAM en las células PK-59. El histograma lleno indica la reacción de las células solo con un anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón marcado con PE) y el histograma vacío indica la reacción de las células con un anticuerpo monoclonal anti-EpCAM humano (Becton, Dickinson and Company). Las Figuras 11B y C son vistas que ilustran FACS que muestran la expresión de glucoproteína-P/MCR1 en las células PK-59 (Figura 11B) y la expresión de ABCG2 en las células PK-59 (Figura 11C). El histograma azul indica la reacción de las células solo con un anticuerpo secundario y el histograma rojo indica la reacción de las células con un anticuerpo anti-glucoproteína-P/MDR1 humano (BD Biosciences Pharmingen) (Figura 11B) o con un anticuerpo anti-ABCG2 humano (BD Biosciences Pharmingen) (Figura 11C). La Figura 11D muestra análisis de FACS, en el que las células PK-59 se tiñeron doblemente con marcadores de células madre de cáncer de páncreas, un anticuerpo anti-CD24 humano marcado con FITC (BD Biosciences Pharmingen) y un anticuerpo anti-CD44 humano marcado con PE (BD Biosciences Pharmingen). Cada número en la Figura 11D indica la relación existente de las celdas en cada fracción.

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

La Figura 12A muestra la evolución temporal del crecimiento tumoral de un grupo de control (●: IgG de ratón) y un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (○) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. *P < 0,05, **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 12B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 21er día (día 21) (el último día del experimento) en el ensayo de la Figura 12A. El valor numérico en cada gráfico indica un valor medio ± desviación típica. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 13 muestra la evaluación de la actividad antitumoral de un clon K5-107 (A), un clon T6-16 (B) y un clon K5-116-2-1 (C) en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células PK-59. El símbolo indica un grupo de control (IgG de ratón), y el símbolo "○" indica un grupo de administración de anticuerpo anti-hTROP-2 (10 mg/kg de peso corporal). La flecha en el gráfico indica un periodo de administración de anticuerpo y el valor numérico en cada gráfico indica un valor medio ± desviación típica. *P < 0,05 (por la prueba de t de Student).

La Figura 14 muestra la evaluación de la actividad antitumoral de un clon K5-70 (Figura 14A), un clon T6-16 (Figura 14B) y un clon K5-116-2-1 (Figura 14C) en modelos de prevención con xenoinjerto usando células PK-59. El símbolo "●" indica un grupo de control (IgG de ratón) y el símbolo "○" indica un grupo de administración de anticuerpo anti-hTROP-2 (10 mg/kg de peso corporal). La flecha en el gráfico indica un periodo de administración de anticuerpo y el valor numérico en cada gráfico indica un valor medio ± desviación típica. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 15 muestra la evaluación de la actividad antitumoral de un clon K5-70 en modelos de prevención y tratamiento con xenoinjerto usando células BxPC-3. La Figura 15A muestra la evolución temporal del crecimiento tumoral de un grupo de control (●: IgG de ratón) y un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (○) en modelos de prevención (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student). La Figura 15B muestra la evolución temporal del crecimiento tumoral de un grupo de control (●: IgG de ratón) y un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (○) en modelos de tratamiento (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. *P < 0,05 (por la prueba de t de Student).

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

La Figura 16A muestra la evolución temporal del crecimiento tumoral de un grupo de control (●: IgG de ratón) y grupos de administración del anticuerpo K5-70 (□: 1 mg/kg de peso corporal, △: 5 mg/kg de peso corporal) a diferentes dosis (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. *P < 0,05 (por la prueba de t de Student), **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 16B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 17º día (Día 17) (el último día del experimento) en el ensayo de la Figura 16A. El valor numérico en cada gráfico indica un valor medio ± desviación típica. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 17 es una vista esquemática de una proteína TROP-2 quimérica humana/de ratón usada en el experimento. SP: secuencias señal; Dominio TY: región de tiroglobulina de tipo 1; TM: región transmembrana; C: región intracelular, en donde la región llena es un polipéptido derivado de hTROP-2, mientras que la región abierta es un polipéptido derivado de TROP-2 de ratón. El número en la posición superior de la vista esquemática de la

proteína quimérica indica el número de aminoácidos de una proteína TROP-2 de ratón y el número en la posición inferior de la misma indica el número de aminoácidos de una proteína hTROP-2.

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

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

Se introdujo un gen de hTROP-2 y cada gen de TROP-2 quimérico humano/de ratón en células HEK293 y después se llevó a cabo análisis de FACS usando las células, en el que los genes se expresaron de forma transitoria. En la Figura 19(A), se estudió la reactividad de anticuerpos K5-70, K5-107, T5-86 y K5-116-2-1 con hTROP-2 (caso superior), con hmTROP-2-A (caso medio) y con hmTROP-2-B (caso inferior). Como control negativo, se usó IgG2b de ratón. En la Figura 19(B), se estudió la reactividad de los anticuerpos T6-4 y T6-16 con hTROP-2 (caso superior), con mhTROP-2-E (caso medio) y con mhTROP-2-F (caso inferior). Como control negativo, se usó IgG2b de ratón.

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

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

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

La Figura 22A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: IgG de ratón) y en un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (○) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica la administración de anticuerpos. *P < 0,05 (por la prueba de t de Student), **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 22B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 28º día (día 28) (el último día del experimento) en el ensayo de la Figura 22A. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 22C muestra la evolución temporal de la formación de tumores en cada ratón en un grupo de control (●: IgG de ratón) y en un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (○). La flecha indica la administración de anticuerpos.

La Figura 23 muestra la actividad antitumoral de un clon K5-70 en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células SW480 de cáncer de colon humano.

La Figura 23A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: IgG de ratón) y en un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (○) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 23B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 44º día (día 44) (el último día del experimento) en el ensayo de la Figura 23A. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 24 muestra la actividad antitumoral de un clon K5-116-2-1 en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células SW480.

La Figura 24A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: IgG de ratón) y en un grupo de administración del anticuerpo K5-116-2-1 (10 mg/kg de peso corporal) (○) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 24B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 42º día (día 42) (el último día del experimento) en el ensayo de la Figura 24A. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 25 muestra la actividad antitumoral de un clon T6-16 en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células SW480.

La Figura 25A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: IgG de ratón) y en un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (10 mg/kg de peso corporal) (○) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. *P < 0,05 (por la prueba de t de Student).

La Figura 25B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 42º día (día 42) (el último día del experimento) en el ensayo de la Figura 25A. *P < 0,05 (por la prueba de t de Student).

La Figura 26 muestra la actividad antitumoral dependiente de dosis de un clon K5-70 en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células SW480.

La Figura 26A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: IgG de ratón) y en un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (○: 1 mg/kg de peso corporal, △: 5 mg/kg de peso corporal, □: 10 mg/kg de peso corporal) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. *P < 0,05 (por la prueba de t de Student). La Figura 26B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 42º día (día 42) (el último día del experimento) en el ensayo de la Figura 26A. *P < 0,05 (por la prueba de t de Student).

La Figura 27 muestra la actividad antitumoral de un clon K5-70 en modelos de tratamiento con xenoinjerto utilizando

células SW480.

La Figura 27A muestra la actividad antitumoral de un anticuerpo K5-70 a intervalos de administración de una vez a la semana. Evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: IgG de ratón) y en un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (○: 10 mg/kg) se muestra (un valor medio ± desviación típica). Las puntas de flecha (días 10, 17, 24, 31 y 38) indican la administración de un anticuerpo K5-70. *P < 0,05 por la prueba de t de Student.

La Figura 27B es una vista que muestra la actividad antitumoral de un anticuerpo K5-70 a intervalos de administración de una vez cada diez días (q10d) o una vez cada dos semanas (q14d). La figura muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: IgG de ratón, 10 mg/kg) y en un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (○: q10d, 10 mg/kg, △: q14d, 10 mg/kg) (un valor medio ± desviación típica). Las puntas de flecha llenas (▼: días 9, 19 y 29) y las puntas de flecha vacías (▽: días 9, 23 y 37) indican la administración de un anticuerpo K5-70. *P < 0,05, **P < 0,01 por la prueba de t de Student. La Figura 28 muestra la actividad antitumoral dependiente de dosis de un clon T6-16 en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células SW480.

La Figura 28A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: IgG de ratón) y en un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (○: 1 mg/kg de peso corporal, △: 5 mg/kg de peso corporal, □: 10 mg/kg de peso corporal) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student). La Figura 28B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 43er día (día 43) (el último día del experimento) en el ensayo de la Figura 28A. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 29 muestra la actividad antitumoral de un clon T6-16 en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células SW480. Se muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: IgG de ratón, 10 mg/kg de peso corporal) y en un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (10 mg/kg de peso corporal) (O: q7d, △: q10d) (un valor medio ± desviación típica). Las puntas de flecha (días 10, 17, 24, 31 y 38) y las flechas (días 10, 20, 30 y 40) indican la administración de un anticuerpo T6-16. La administración se llevó a cabo una vez cada tres días al grupo de control. *P < 0,05, **P < 0,01 por la prueba de t de Student.

La Figura 30 muestra la actividad antitumoral de un clon K5-70 en modelos de prevención de xenoinjerto usando células de próstata humana DU-145.

La Figura 30A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: IgG de ratón) y en un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (○) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. *P < 0,05 (por la prueba de t de Student). La Figura 30B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 40º día (día 40) (el último día del experimento) en el ensayo de la Figura 30A. *P < 0,05 (por la prueba de t de Student).

La Figura 31 muestra la actividad inhibidora de metástasis de un clon K5-70 en modelos metastásicos de hígado usando células PK-59.

Las Figuras 31A y 31B muestran la imagen del hígado extirpado de un grupo de control (●: IgG de ratón) (A) y un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (B), que se tomaron 6 semanas después del trasplante celular. Las flechas indican focos metastásicos del hígado.

La Figura 32 muestra la actividad antitumoral de K5-70 en modelos de xenoinjerto usando células SW480, que son modelos de cáncer recidivante después de la administración de clorhidrato de irinotecán. Esta figura muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo sin tratamiento (♦), en un grupo de administración de clorhidrato de irinotecán (40 mg/kg de peso corporal) + anticuerpo K5-70 (○: 10 mg/kg de peso corporal) y en un grupo de administración de clorhidrato de irinotecán (40 mg/kg de peso corporal) + IgG de ratón (●: 10 mg/kg de peso corporal) (un valor medio ± desviación típica). Las puntas de flecha (días 11, 14 y 17) indican la administración de clorhidrato de irinotecán. El anticuerpo K-70 o la IgG de ratón se administraron una vez cada tres días a partir del día 20. La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. *P < 0,05, **P < 0,01 por la prueba de t de Student.

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

La Figura 34 muestra la secuencia de nucleótidos de ADNc de una región variable de cadena L (VL) del clon K5-70 (SEQ ID NO: 39) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 40). Un péptido señal se muestra en cursiva. El ácido aspártico (D) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *RASQSIGTSIH, YASESIS* y *QQSNSWPFT)* se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al*. (como se ha descrito anteriormente; Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VL del clon K5-70 se muestran en las SEQ ID NO: 41 a 43, respectivamente.

La Figura 35 muestra la secuencia de nucleótidos de ADNc de una región variable de cadena H (VH) del clon K5-107 (SEQ ID NO: 44) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 45). Un péptido señal se muestra en cursiva. La glutamina (Q) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *SYWMH, NIYPGGGYTNYDEKFKS* y *SSVFDY)* se determinaron de acuerdo con

las definiciones de Kabat *et al*. (como se ha descrito anteriormente; Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VH del clon K5-107 se muestran en las SEQ ID NO: 46 a 48, respectivamente.

La Figura 36 muestra la secuencia de nucleótidos de ADNc de una región variable de cadena L (VL) del clon K5-107 (SEQ ID NO: 49) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 50). Un péptido señal se muestra en cursiva. El ácido aspártico (D) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *RASQNIGTSIH, YASESIS* y *QQSNSWPFT)* se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al*. (como se ha descrito anteriormente; Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VL del clon K5-107 se muestran en las SEQ ID NO: 51 a 53, respectivamente.

La Figura 37 muestra la secuencia de nucleótidos de ADNc de una región variable de cadena H (VH) del clon K5-116-2-1 (SEQ ID NO: 54) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 55). Un péptido señal se muestra en cursiva. La glutamina (Q) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *SYWIT, NIYPSDSYTNYNQKFRD* y *LFDY)* se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al*. (como se ha descrito anteriormente; Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VH del clon K5-116-2-1 se muestran en las SEQ ID NO: 56 a 58, respectivamente.

La Figura 38 muestra la secuencia de nucleótidos de ADNc de una región variable de cadena L (VL) del clon K5-116-2-1 (SEQ ID NO: 59) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 60). Un péptido señal se muestra en cursiva. El ácido aspártico (D) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *RASQSIGTSIH, YASESIS* y *QQSNSWPFT)* se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al*. (como se ha descrito anteriormente; Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VL del clon K5-116-2-1 se muestran en las SEQ ID NO: 61 a 63, respectivamente.

La Figura 39 muestra la secuencia de nucleótidos de ADNc de una región variable de cadena H (VH) del clon T6-16 (SEQ ID NO: 64) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 65). Un péptido señal se muestra en cursiva. El ácido glutámico (E) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *DYNMH, YIYPYNGGTGYNQRFKS* y *EDYGSSPSYAMDY)* se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al*. (como se ha descrito anteriormente; Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VH del clon T6-16 se muestran en las SEQ ID NO: 66 a 68, respectivamente.

La Figura 40 muestra la secuencia de nucleótidos de ADNc de una región variable de cadena L (VL) del clon T6-16 (SEQ ID NO: 69) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 70). Un péptido señal se muestra en cursiva. El ácido aspártico (D) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *RSSQSLVHGNGNTYLH, KVSNRFS* y *SQTTHVPT)* se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al*. (como se ha descrito anteriormente; Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VL del clon T6-16 se muestran en las SEQ ID NO: 71 a 73, respectivamente.

La Figura 41 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 35) de la región variable de cadena H de un clon K5-70 (K5-70 VH), la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 75) de la región variable de cadena H de un K5-70 humanizado (HuK5-70 VH) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 85) de la región variable de cadena H de un aceptor (n.º de referencia de Genbank DA980102; SEQ ID NO: 84) usada para la producción del anticuerpo humanizado (DA980102 VH). (Debe observarse que cada una de las secuencias de aminoácidos mostradas en la figura indica una parte de la secuencia de aminoácidos de cada región variable de cadena H (específicamente, la secuencia de aminoácidos de una parte de proteína madura a partir de la cual se retira una parte de péptido señal)).

La secuencia de aminoácidos subrayada en el K5-70 VH indica una secuencia de CDR determinada de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al*. (como se ha descrito anteriormente; Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991). Además, el número en la posición superior de la secuencia de aminoácidos indica el número de posición de un aminoácido determinado de acuerdo con las definiciones mencionadas anteriormente de Kabat *et al*. Cada secuencia de CDR en el DA980102 VH se expresa con el símbolo "---", y por tanto se omite la descripción. Ya que se suponía que el aminoácido subrayado en el HuK5-70 VH era importante para el mantenimiento de la estructura de CDR, se mantuvo la secuencia del K5-70 VH. Además, con respecto al aminoácido con doble subrayado en el HuK5-70 VH, el aminoácido del DA980102 VH correspondiente (metionina (M)) rara vez se encuentra en esta posición. Por lo tanto, con el fin de reducir la antigenicidad, el aminoácido con doble subrayado en el HuK5-70 VH fue sustituido con leucina (L) como un aminoácido representativo que pertenece al mismo subgrupo.

La Figura 42 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 40) de la región variable de cadena L de un clon K5-70 (K5-70 VL), la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 77) de la región variable de cadena L de un K5-70 humanizado (HuK5-70 VL) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 87; n.º de referencia de GenBank AAA64877) de la región variable de cadena L de un aceptor (n.º de referencia de Genbank L41174; SEQ ID NO: 86) usada para la producción del anticuerpo humanizado (L41174 VL). (Debe observarse que cada una de las secuencias de aminoácidos mostradas en la figura indica una parte de la secuencia de aminoácidos de cada región variable de cadena L (específicamente, la secuencia de aminoácidos de una parte de proteína madura a partir de la cual se retira una parte de péptido señal)).

La secuencia de aminoácidos subrayada en el K5-70 VL indica una secuencia de CDR determinada de acuerdo

con las definiciones de Kabat *et al*. (como se ha descrito anteriormente; Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991). Además, el número en la posición superior de la secuencia de aminoácidos indica el número de posición de un aminoácido determinado de acuerdo con las definiciones mencionadas anteriormente de Kabat *et al*. Cada secuencia de CDR en el L41174 VL se expresa con el símbolo "---", y por tanto se omite la descripción. Ya que se suponía que el aminoácido subrayado en el HuK5-70 VL era importante para el mantenimiento de la estructura de CDR, se mantuvo la secuencia del K5-70 VL.

La Figura 43 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 65) de la región variable de cadena H de un clon T6-16 (T6-16 VH), las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 79 y 81, respectivamente) de las regiones variables de cadena H de dos tipos de T6-16 humanizado (HuT6-16 VH1 y HuT6-16 VH2) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 89) de la región variable de cadena H de un aceptor (n.º de referencia de Genbank DA935238; SEQ ID NO: 88) usada para la producción del anticuerpo humanizado (DA935238 VH). (Debe observarse que cada una de las secuencias de aminoácidos mostradas en la figura indica una parte de la secuencia de aminoácidos de cada región variable de cadena H (específicamente, la secuencia de aminoácidos de una parte de proteína madura a partir de la cual se retira una parte de péptido señal)).

La secuencia de aminoácidos subrayada en el HuT6-16 VH indica una secuencia de CDR determinada de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al*. (como se ha descrito anteriormente; Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991). Además, el número en la posición superior de la secuencia de aminoácidos indica el número de posición de un aminoácido determinado de acuerdo con las definiciones mencionadas anteriormente de Kabat *et al*. Cada secuencia de CDR en el DA935238 VH se expresa con el símbolo "---", y por tanto se omite la descripción. Ya que se suponía que los aminoácidos subrayados en el HuT6-16 VH1 y el HuT6-16 VH2 eran importantes para el mantenimiento de la estructura de CDR, se mantuvo la secuencia del T6-16 VH. Además, la lisina (K) en la posición 73 en el HuT6-16 VH1 se sustituyó con una treonina (T) derivada de DA935238 como una secuencia aceptora en el HuT6-16 VH2.

La Figura 44 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 70) de la región variable de cadena L de un clon T6-16 (T6-16 VL), la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 83) de la región variable de cadena L de un T6-16 humanizado (HuT6-16 VL) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 91; n.º de referencia de GenBank AAA60341) de la región variable de cadena L de un aceptor (n.º de referencia de Genbank M99608; SEQ ID NO: 90) usada para la producción del anticuerpo humanizado (M99608 VL). (Debe observarse que cada una de las secuencias de aminoácidos mostradas en la figura indica una parte de la secuencia de aminoácidos de cada región variable de cadena L (específicamente, la secuencia de aminoácidos de una parte de proteína madura a partir de la cual se retira una parte de péptido señal)).

La secuencia de aminoácidos subrayada en el T6-16 VL indica una secuencia de CDR determinada de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al*. (como se ha descrito anteriormente; Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991). Además, el número en la posición superior de la secuencia de aminoácidos indica el número de posición de un aminoácido determinado de acuerdo con las definiciones mencionadas anteriormente de Kabat *et al*. Cada secuencia de CDR en el M99608 VL se expresa con el símbolo "---", y por tanto se omite la descripción.

La Figura 45 muestra la secuencia génica (SEQ ID NO: 74) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 75) de HuK5-70 VH. La posición superior de cada línea indica la secuencia génica (secuencia de ADNc) y la posición inferior de la misma indica la secuencia de aminoácidos. En la secuencia de aminoácidos, una parte de péptido señal está subrayada con una línea discontinua y cada secuencia de CDR (CDR 1 a 3) está subrayada con una línea continua (la secuencia de aminoácidos de solo la parte de proteína madura, de donde se retira la parte del péptido señal, se muestra en la SEQ ID NO: 92). Se añadieron un sitio EcoRI (GAA TTC) y una secuencia Kozak (ACC ACC) al extremo 5' del gen de HuK5-70 VH, y se añadió un sitio NheI (GCT AGC) al extremo 3' del mismo.

La Figura 46 muestra la secuencia génica (SEQ ID NO: 76) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 77) de HuK5-70 VL. La posición superior de cada línea indica la secuencia génica (secuencia de ADNc) y la posición inferior de la misma indica la secuencia de aminoácidos. En la secuencia de aminoácidos, una parte de péptido señal está subrayada con una línea discontinua y cada secuencia de CDR (CDR 1 a 3) está subrayada con una línea continua (la secuencia de aminoácidos de solo la parte de proteína madura, de donde se retira la parte del péptido señal, se muestra en la SEQ ID NO: 93). Se añadieron un sitio AgeI (ACC GGT) y una secuencia Kozak (ACC ACC) al extremo 5' del gen de HuK5-70 VL y se añadió un sitio BsiWI (CGT ACG) al extremo 3' del mismo.

La Figura 47 muestra la secuencia génica (SEQ ID NO: 78) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 79) de HuT6-16 VH1. La posición superior de cada línea indica la secuencia génica (secuencia de ADNc) y la posición inferior de la misma indica la secuencia de aminoácidos. En la secuencia de aminoácidos, una parte de péptido señal está subrayada con una línea discontinua y cada secuencia de CDR (CDR 1 a 3) está subrayada con una línea continua (la secuencia de aminoácidos de solo la parte de proteína madura, de donde se retira la parte del péptido señal, se muestra en la SEQ ID NO: 94). Se añadieron un sitio EcoRI (GAA TTC) y una secuencia Kozak (ACC ACC) al extremo 5' del gen de HuT6-16 VH1 y se añadió un sitio NheI (GCT AGC) al extremo 3' del mismo.

La Figura 48 muestra la secuencia génica (SEQ ID NO: 80) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 81) de HuT6-16 VH2. La posición superior de cada línea indica la secuencia génica (secuencia de ADNc) y la posición inferior de la misma indica la secuencia de aminoácidos. En la secuencia de aminoácidos, una parte de péptido señal está subrayada con una línea discontinua y cada secuencia de CDR (CDR 1 a 3) está subrayada con una línea continua (la secuencia de aminoácidos de solo la parte de proteína madura, de donde se retira la parte del péptido señal, se muestra en la SEQ ID NO: 95). Se añadieron un sitio EcoRI (GAA TTC) y una secuencia Kozak (ACC ACC) al extremo 5' del gen de HuT6-16 VH2 y se añadió un sitio NheI (GCT AGC) al extremo 3' del mismo.

La Figura 49 muestra la secuencia génica (SEQ ID NO: 82) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 83) de

HuT6-16 VL. La posición superior de cada línea indica la secuencia génica (secuencia de ADNc) y la posición inferior de la misma indica la secuencia de aminoácidos. En la secuencia de aminoácidos, una parte de péptido señal está subrayada con una línea discontinua y cada secuencia de CDR (CDR 1 a 3) está subrayada con una línea continua (la secuencia de aminoácidos de solo la parte de proteína madura, de donde se retira la parte del péptido señal, se muestra en la SEQ ID NO: 96). Se añadieron un sitio AgeI (ACC GGT) y una secuencia Kozak (ACC ACC) al extremo 5' del gen de HuT6-16 VL y se añadió un sitio BsiWI (CGT ACG) al extremo 3' del mismo.

La Figura 50 muestra los resultados obtenidos al confirmar la expresión del anticuerpo HuK5-70, anticuerpo HuT6-16-1 y anticuerpo HuT6-16-2.

Figura 50(A) Los vectores de expresión pFUSE-CHIg-HuK5-70 y pFUSE2-CLIg-HuK5-70 se introdujeron en células 293F y la expresión del anticuerpo HuK5-70 en el sobrenadante de cultivo se analizó mediante transferencia de Western. El carril 1 indica el sobrenadante de cultivo de células 293F en las que no se introdujeron genes (control negativo) y el carril 2 indica el sobrenadante de cultivo de células 293F en las que se introdujeron los vectores de expresión mencionados anteriormente. Las proteínas de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo HuK5-70 se detectaron con un anticuerpo $F(ab')^2$ anti-IgG humano marcado con biotina.

Figura 50(B) Los vectores de expresión pFUSE-CHIg-HuT6-16-1 y pFUSE2-CLIg-HuT6-16 (carril 3) y los vectores de expresión pFUSE-CHIg-HuT6-16-2 y pFUSE2-CLIg-HuT6-16 (carril 4) se introdujeron en células 293F en estas combinaciones. Después, la expresión del anticuerpo HuT6-16-1 y el anticuerpo HuT6-16-2 se analizó mediante transferencia de Western. Las proteínas de cadena pesada del anticuerpo HuT6-16-1 y el anticuerpo HuT6-16-2 se detectaron con un anticuerpo Fc anti-IgG humano marcado con biotina y las proteínas de cadena ligera del anticuerpo HuT6-16-1 y el anticuerpo HuT6-16-2 se detectaron con un anticuerpo $F(ab')^2$ anti-IgG humano marcado con biotina.

La Figura 51 muestra los resultados obtenidos al teñir el anticuerpo HuK5-70 purificado, el anticuerpo HuT6-16-1 y el anticuerpo HuT6-16-2 con Coomassie.

El anticuerpo HuK5-70 purificado (carril 1), el anticuerpo HuT6-16-1 (carril 2) y el anticuerpo HuT6-16-2 (carril 3) se cargaron en cantidades de 1 µg cada uno en SDS-PAGE y después se tiñeron con Coomassie.

La Figura 52 muestra los resultados obtenidos al analizar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo HuK5-70, el anticuerpo HuT6-16-1 y el anticuerpo HuT6-16-2, usando un citómetro de flujo.

La reactividad de cada anticuerpo mostrado en la figura con células HEK293-hTROP-2 (Figura 52A) y células PK-59 (Figura 52B) se analizó mediante FACS. El anticuerpo secundario solo se usó como control negativo (lleno) y la reactividad de cada anticuerpo se indicó con una línea gris.

La Figura 53 muestra los resultados obtenidos midiendo la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo HuK5-70 según un método de ELISA.

La capacidad de unión a antígeno del anticuerpo K5-70 y el anticuerpo HuK5-70 se analizó según un método de ELISA recubierto con antígeno. El símbolo ▲ indica los resultados de la medición del anticuerpo K5-70, y el símbolo ● indica los resultados de la medición del anticuerpo HuK5-70.

La Figura 54 muestra los resultados obtenidos midiendo la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo HuT6-16-1 y el anticuerpo HuT6-16-2 según un método de ELISA.

La capacidad de unión a antígeno del anticuerpo T6-16, el anticuerpo HuT6-16-1 y HuT6-16-2 se analizó según un método de ELISA recubierto con antígeno. El símbolo ▲ indica los resultados de la medición del anticuerpo T6-16, el símbolo ● indica los resultados de la medición del anticuerpo HuT6-16-1 y el símbolo ■ indica los resultados de la medición del anticuerpo HuT6-16-2.

La Figura 55 muestra la actividad antitumoral de un anticuerpo anti-hTROP-2 humanizado (anticuerpo HuK5-70) en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células SW480 de cáncer de colon humano.

La Figura 55A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: PBS) y en un grupo de administración del anticuerpo HuK5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (○) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. *P < 0,05, **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 55B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 39º día (día 39) (el último día del experimento) en el ensayo de la Figura 55A. *P < 0,05 (por la prueba de t de Student).

La Figura 56 muestra la actividad antitumoral dependiente de dosis de un anticuerpo anti-hTROP-2 humanizado (HuK5-70) en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células SW480 de cáncer de colon humano.

La Figura 56A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: PBS) y en un grupo de administración del anticuerpo HuK5-70 (○: 1 mg/kg de peso corporal, △: 5 mg/kg de peso corporal, □: 10 mg/kg de peso corporal) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 56B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 48º día (día 48) (el último día del experimento) después del trasplante de células cancerosas en el ensayo de la Figura 56A. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 57 muestra la actividad antitumoral dependiente de dosis de un anticuerpo anti-hTROP-2 humanizado (HuT6-16-2) en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células SW480 de cáncer de colon humano.

La Figura 57A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: PBS) y en un grupo de administración del anticuerpo HuT6-16-2 (○: 1 mg/kg de peso corporal, △: 5 mg/kg de peso corporal, □: 10 mg/kg de peso corporal) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 57B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 48º día (día 48) (el último

día del experimento) después del trasplante de células cancerosas en el ensayo de la Figura 57A. *P < 0,05 (por la prueba de t de Student).

La Figura 58 muestra la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-hTROP-2 de ratón (K5-70 y T6-16) en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células SK-OV-3 de cáncer de ovario humano.

La Figura 58A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: PBS), en un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (○) y en un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (10 mg/kg de peso corporal) (△) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. *P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 58B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 56º día (día 56) (el último día del experimento) después del trasplante de células cancerosas en el ensayo de la Figura 58A. *P < 0,05 (por la prueba de t de Student).

La Figura 59 muestra la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-hTROP-2 de ratón (K5-70 y T6-16) en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células MDA-MB-468 de cáncer de mama humano.

La Figura 59A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: PBS), en un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (○) y en un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (10 mg/kg de peso corporal) (△) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 59B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 54º día (día 54) (el último día del experimento) después del trasplante de células cancerosas en el ensayo de la Figura 59A. *P < 0,05, **P < 0,01 (por la prueba de t de Student). La Figura 60 muestra la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-hTROP-2 de ratón (K5-70 y T6-16) en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando células Calu-3 de cáncer de pulmón humano.

La Figura 60A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: PBS), en un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (○) y en un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (10 mg/kg de peso corporal) (△) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. *P < 0,05, **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 60B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 41er día (día 41) (el último día del experimento) después del trasplante de células cancerosas en el ensayo de la Figura 60A. *P < 0,05, **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 61 muestra la actividad antitumoral de un anticuerpo K5-70 anti-hTROP-2 de ratón en modelos de prevención con xenoinjerto usando células TFK-1 de cáncer de conducto biliar humano.

La Figura 61A muestra la evolución temporal de la formación de tumores en un grupo de control (●: PBS) y en un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (○) (un valor medio ± desviación típica). La flecha indica un periodo de administración de anticuerpos. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 61B muestra el peso tumoral representado de cada ratón en el momento del 31er día (día 31) (el último día del experimento) después del trasplante de células cancerosas en el ensayo de la Figura 61A. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 62 muestra los resultados obtenidos analizando la actividad de unión de los anticuerpos HuK5-70 y HuT6-16-2 de según ELISA recubierto con antígeno de baja densidad. Una placa de 96 pocillos se recubrió con una proteína recombinante hTACSTD2-Fc-His 0,1 µg/ml y, a continuación, se permitió que los anticuerpos de ensayo (anticuerpos K5-70, HuK5-70, T6-16 y HuT6-16-2), que se habían preparado en concentraciones de 20 µg/ml a una serie de diluciones dobles, reaccionaran con la proteína. En la Figura 62(A), se usaron los anticuerpos K5-70 (A) y HuK5-70 (●) como anticuerpos de ensayo y, en la Figura 62 (B), se usaron los anticuerpos T6-16 (A) y HuT6-16-2 (●) como anticuerpos de ensayo.

La Figura 63 muestra los resultados obtenidos al analizar la actividad de unión de hTROP-2 con los anticuerpos K5-70 y HuK5-70 mediante ELISA. Una placa de 96 pocillos se recubrió con los anticuerpos K5-70 y HuK5-70 mediante IgG anti-ratón (específica de la cadena γ) e IgG1 antihumana (específica de Fcγ) y, a continuación, se permitió que estos anticuerpos reaccionaran con las proteínas hTROP-2-EC-His, que se habían preparado en concentraciones de 5 µg/ml a una serie de diluciones dobles. La unión de dicha proteína hTROP-2-EC-His se detectó usando un anticuerpo anti-marcador de His.

(▲) anticuerpo K5-70 y (●) anticuerpo HuK5-70.

La Figura 64 muestra la secuencia de nucleótidos (fila superior; SEQ ID NO: 99) y secuencia de aminoácidos (fila inferior; SEQ ID NO: 35) de un gen de K5-70 VH que se preparó mediante síntesis génica. Con respecto a esta secuencia de nucleótidos, se añadieron un sitio EcoRI (GAA TTC) y una secuencia Kozak (ACC ACC) al extremo 5' y un sitio NheI (GCT AGC) al extremo 3'. La secuencia de aminoácidos se muestra mediante un código de una letra. Un péptido señal en el lado N-terminal se muestra en cursiva. La glutamina (Q) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *IYWIN, NIYPSDSYTNYNQKFKD* y *TSMADY)* se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al*. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, quinta edición, Publicación del NIH N.º 91-3242, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VH del clon K5-70 se muestran en las SEQ ID NO: 36 a 38, respectivamente.

La Figura 65 muestra la secuencia de nucleótidos (fila superior; SEQ ID NO: 100) y secuencia de aminoácidos (fila inferior; SEQ ID NO: 40) de un gen de K5-70 VL que se preparó mediante síntesis génica. Con respecto a esta secuencia de nucleótidos, se añadieron un sitio AgeI (ACC GGT) y una secuencia Kozak (ACC ACC) al extremo 5' y un sitio BsiWI (CGT ACG) al extremo 3'. La secuencia de aminoácidos se muestra mediante un código de una

letra. Un péptido señal en el lado N-terminal se muestra en cursiva. El ácido aspártico (D) con doble subrayado indica el resto de aminoácido N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de CDR (subrayadas; *RASQSIGTSIH, YASESIS* y *QQSNSWPFT)* se determinaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al*. (como se ha descrito anteriormente, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991). Las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la VL del clon K5-70 se muestran en las SEQ ID NO: 41 a 43, respectivamente.

La Figura 66 muestra la actividad de unión de anticuerpos ChK5-70, HuK5-70, HuVH/MuVL (en el que el VL del anticuerpo HuK5-70 se sustituye con el VL del anticuerpo K5-70) y MuVH/HuVL (en el que el VH del anticuerpo HuK5-70 se sustituye con el VH del anticuerpo K5-70) para hTROP-2. Una placa de 96 pocillos se recubrió con una proteína recombinante hTACSTD2-Fc-His 0,1 µg/ml. Un sobrenadante de cultivo de células, en el que se habían expresado de manera transitoria anticuerpos de ensayo (anticuerpos ChK5-70, HuK5-70, HuVH/MuVL y MuVH/HuVL), se diluyó para dar como resultado concentraciones de anticuerpos de 1, 0,1, 0,01 y 0,001 µg/ml. Por tanto, se permitió que los anticuerpos de ensayo diluidos reaccionaran con el antígeno. (▲) anticuerpo ChK5-70, (△) anticuerpo MuVH/HuVL, (○) anticuerpo HuVH/MuVL y (●) anticuerpo HuK5-70.

La Figura 67 muestra las secuencias de aminoácidos de HuK5-70 VH y sus mutantes de sustitución de aminoácidos. Los aminoácidos se muestran por un código de una letra. El aminoácido de cada mutante de sustitución de aminoácidos, que es el mismo que el de HuK5-70 VH, se indica con el símbolo "-" y solo los aminoácidos sustituidos se muestran con un código de una letra. El número en la posición superior de la secuencia indica un número de aminoácido (Kabat *et al*., 1991).

La Figura 68 muestra la actividad de unión de anticuerpos ChK5-70, HuK5-70, HuK5-70 VH A40R (un mutante en el que la alanina en la posición 40 del VH del anticuerpo HuK5-70 se sustituye con una arginina) y HuK5-70 VH R44G (un mutante en el que la arginina en la posición 44 del VH de el anticuerpo HuK5-70 se sustituye con una glicina) para hTROP-2. Una placa de 96 pocillos se recubrió con una proteína recombinante hTACSTD2-Fc-His 0,1 µg/ml. Un sobrenadante de cultivo de células, en el que se habían expresaron de manera transitoria anticuerpos (anticuerpos ChK5-70, HuK5-70, HuK5-70 VH A40R y HuK5-70 VH R44G), se diluyó para dar como resultado concentraciones de 0,5 µg/ml a una serie de diluciones dobles (seis muestras). Por tanto, se permitió que los anticuerpos de ensayo diluidos reaccionaran con el antígeno. (A) anticuerpo ChK5-70, (△) anticuerpo HuK5-70 VH R44G, (○) anticuerpo HuK5-70 VH A40R y (●) anticuerpo HuK5-70.

La Figura 69 muestra la secuencia de nucleótidos (fila superior) y la secuencia de aminoácidos (fila inferior) de un gen de HuK5-70 VH R44G que se preparó mediante síntesis génica. Con respecto a esta secuencia de nucleótidos, se añadieron un sitio EcoRI (GAA TTC) y una secuencia Kozak (ACC ACC) al extremo 5' y un sitio NheI (GCT AGC) al extremo 3'. La secuencia de aminoácidos se muestra mediante un código de una letra. Un péptido señal en el lado N-terminal se muestra en cursiva. El aminoácido (Q: glutamina) en el lado N-terminal de VH maduro tiene subrayado doble y la secuencia de CDR (Kabat *et al*., 1991) está subrayada.

La Figura 70 muestra la SDS-PAGE realizada en un anticuerpo HuK5-70-2 purificado. El anticuerpo HuK5-70-2 (1 µg) se cargó en un gel SDS-PAGE al 11 % en condiciones reductoras. Carril 1: un marcador de peso molecular (Patrón Doble Precision Plus (BIO-RAD)), carril 2: un anticuerpo HuK5-70-2. El valor numérico en el lado izquierdo de la figura indica un peso molecular.

La Figura 71 muestra la actividad de unión de los anticuerpos K5-70, HuK5-70 y HuK5-70-2 contra hTROP-2. Una placa de 96 pocillos se recubrió con una proteína recombinante hTACSTD2-Fc-His 0,1 µg/ml. Los anticuerpos de ensayo purificados (anticuerpos K5-70, HuK5-70 y HuK5-70-2) se diluyeron para dar como resultado concentraciones de 1 µg/ml a una serie de diluciones dobles (diez muestras). Por tanto, se permitió que los anticuerpos de ensayo diluidos reaccionaran con el antígeno. (■) anticuerpo K5-70, (△) anticuerpo HuK5-70-2 y (●) anticuerpo HuK5-70.

La Figura 72A muestra la actividad ADCC de anticuerpos anti-hTROP-2 humanizados (columna vacía: HuK5-70 y columna llena: HuT6-16-2). Más específicamente, se añadieron un anticuerpo HuK5-70 y un anticuerpo HuT6-16-2 (todos los cuales estaban en concentraciones de 0, 0,1, 0,3, 1, 3 y 10 µg/ml) y monocitos de sangre periférica humana sana a una línea celular de cáncer de colon humano SW480 y después se cultivaron durante 6 horas. A continuación, Se midió la actividad de LDH liberada en el sobrenadante de cultivo, para poder medir la actividad ADCC (un valor medio ± desviación típica (N = 3), efector/diana (E/T) = 40). La concentración de anticuerpo que es 0 indica ausencia de adición del anticuerpo. *P < 0,05, **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 72B muestra la actividad ADCC de anticuerpos anti-hTROP-2 humanizados (columna vacía: HuK5-70, columna gris: HuK5-70-2 y columna llena: HuT6-16-2). Más específicamente, se añadieron un anticuerpo HuK5-70, un anticuerpo HuK5-70-2 y un anticuerpo HuT6-16-2 (todos los cuales estaban en concentraciones de 0, 0,3, 1, 3, 10 y 30 µg/ml) y monocitos de sangre periférica humana sana a una línea celular de cáncer de páncreas humano (PK-59) y después se cultivaron durante 6 horas. A continuación, Se midió la actividad de LDH liberada en el sobrenadante de cultivo, para poder medir la actividad ADCC (un valor medio ± desviación típica (N = 3), efector/diana (E/T) = 40). La concentración de anticuerpo que es 0 indica ausencia de adición del anticuerpo. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

La Figura 72C muestra la actividad ADCC de anticuerpos anti-hTROP-2 humanizados (columna vacía: HuK5-70, columna gris: HuK5-70-2 y columna llena: HuT6-16-2). Más específicamente, se añadieron un anticuerpo HuK5-70, un anticuerpo HuK5-70-2 y un anticuerpo HuT6-16-2 (todos los cuales estaban en concentraciones de 0, 0,3, 1, 3, 10 y 30 µg/ml) y monocitos de sangre periférica humana sana a una línea celular de cáncer de próstata humano (PC-3) y después se cultivaron durante 6 horas. A continuación, Se midió la actividad de LDH liberada en el sobrenadante de cultivo, para poder medir la actividad ADCC (un valor medio ± desviación típica (N = 3),

efector/diana (E/T) = 40). La concentración de anticuerpo que es 0 indica ausencia de adición del anticuerpo. **P < 0,01 (por la prueba de t de Student).

Descripción detallada de la invención

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con detalle. Las siguientes descripciones no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

1. Sumario de la presente invención

Como se ha mencionado anteriormente, el TROP-2 humano (hTROP-2) es una proteína de membrana de tipo 1 con un solo dominio transmembrana, que tiene una longitud completa de 323 restos de aminoácidos. Se sabe que un gen de hTROP-2 y un producto génico del mismo se expresan en diversos tipos de células cancerosas.

Como se ha mencionado anteriormente, se ha deseado desarrollar un anticuerpo anti-hTROP-2 (un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2) o similares que tengan alta actividad antitumoral *in vivo.* En estas circunstancias, el presente inventor realizó una exploración a través de un número extremadamente grande de clones y, como resultado, el inventor logró obtener un clon que tenía alta actividad antitumoral *in vivo.* Específicamente, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal, que reconoce específicamente la región extracelular de hTROP-2 *in vivo* y, en particular, un anticuerpo monoclonal que presenta alta afinidad en un orden picomolar (pM). El anticuerpo de la presente invención es extremadamente útil porque es un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (en particular, un anticuerpo humanizado), que presenta actividad inhibidora del crecimiento tumoral significativa a una dosis menor que la del anticuerpo anti-hTROP-2 existente (por ejemplo, a una dosis de 1/20) cuando se administra individualmente como un anticuerpo desnudo y que también presenta actividad inhibidora del crecimiento tumoral significativa en modelos de tratamiento de ratones portadores de tumores, en el que se usan múltiples tipos de células cancerosas humanas.

2. Producción de anticuerpo anti-hTROP-2

(1) Preparación de antígeno

Se desvela información acerca de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de hTROP-2 en el "Número de referencia NP_002344" en el sitio web de, por ejemplo, NCBI (GenBank) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Se desvela información acerca de una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) que codifica la secuencia de aminoácidos de hTROP-2 en el "Número de referencia NM_002353" en el mismo sitio web que se ha descrito anteriormente.

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

Un péptido usado como antígeno puede producirse mediante síntesis química o mediante síntesis según un método de ingeniería genética usando *Escherichia coli* o similares. Se puede aplicar un método bien conocido por los expertos en la materia.

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

Cuando un péptido se sintetiza mediante un método de ingeniería genética, en primer lugar, se diseña y sintetiza el ADN que codifica el péptido. El diseño y la síntesis de dicho ADN se puede llevar a cabo según un método de PCR, usando un vector que comprende un gen de hTROP-2 de longitud completa o similar como molde y también usando cebadores diseñados para poder sintetizar una región de ADN deseada. A continuación, el ADN se liga a un vector adecuado para obtener un vector recombinante usado para la expresión de proteínas y este vector recombinante se introduce después en un hospedador de modo que se pueda expresar en el mismo un gen de interés, obteniendo de este modo un transformante (Sambrook J. *et al*., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

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

Se cultiva el transformante descrito anteriormente y después se recoge del cultivo un péptido usado como antígeno. El término "cultivo" se usa en el presente documento para indicar tanto (a) un sobrenadante de cultivo como (b) células cultivadas, una masa celular cultivada o un producto disgregado de la misma.

Después de finalizar el cultivo, cuando se produce un péptido de interés en una masa celular o en células, el péptido se extrae disgregando la masa celular o las células. Por otro lado, cuando se produce un péptido de interés fuera de una masa celular o fuera de las células, se usa directamente una solución de cultivo o se retiran la masa celular o las células de la solución de cultivo por centrifugación o similares. A continuación, el péptido de interés puede aislarse y purificarse mediante un solo uso de métodos bioquímicos habitualmente usados en el aislamiento y la purificación de péptidos, tales como la precipitación de sulfato de amonio, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad, o combinando adecuadamente los métodos bioquímicos mencionados anteriormente.

Un péptido usado como antígeno también puede obtenerse mediante traducción *in vitro* usando un sistema de síntesis sin células. En este caso, se pueden aplicar dos métodos, a saber, un método que usa ARN como molde y un método que usa ADN como molde (transcripción/traducción). Como dicho sistema de síntesis sin células, se puede usar un sistema disponible en el mercado, tal como el sistema Expressway™ (Invitrogen), PURESYSTEM (marca registrada; Post Genome Institute) o sistema TNT (marca registrada; Promega).

El péptido obtenido de este modo puede unirse a una proteína transportadora adecuada tal como la albúmina sérica bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH), tiroglobulina humana o γ-globulina de pollo.

Por otra parte, el antígeno puede ser un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una supresión, sustitución o adición de uno o más aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de hTROP-2 (SEQ ID NO: 2) o una secuencia parcial de la misma como se ha descrito anteriormente. Se puede usar, por ejemplo, un péptido que consta de una secuencia de aminoácidos, en el que uno o más (preferentemente uno o varios (por ejemplo, 1 a 10 y más preferentemente 1 a 5)) aminoácidos se eliminan o uno o más (preferentemente uno o varios (por ejemplo, 1 a 10 y más preferentemente 1 a 5)) aminoácidos se sustituyen con otros aminoácidos o uno o más (preferentemente uno o varios (por ejemplo, 1 a 10 y más preferentemente 1 a 5)) aminoácidos adicionales se añaden, con respecto a la secuencia de aminoácidos de hTROP-2 o una secuencia parcial de la misma.

El gen para introducir en una célula o similar es un gen que codifica una proteína hTROP-2 o un fragmento parcial de la misma, o una proteína mutante de la misma o un fragmento de la misma. Como tal gen, puede usarse un gen que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia parcial de la misma, por ejemplo.

Asimismo, como un gen para introducir en una célula o similar, también se puede usar una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia complementaria de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y que codifica una proteína que tiene actividad hTROP-2 o una secuencia parcial de la misma.

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

La mutación se puede introducir en un gen según un método conocido tal como un método de Kunkel o un método de dúplex con huecos, usando, por ejemplo, un kit de introducción de mutaciones que utiliza mutagénesis dirigida, tal como el sistema de mutagénesis dirigida Gene-Tailor™ (fabricado por Invitrogen) o el sistema de mutagénesis dirigida TaKaRa (Mutan-K, Mutan-Super Express Km, etc.; fabricado por Takara Bio Inc.).

(2) Producción de anticuerpo policlonal

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

La dosis del antígeno por animal se puede determinar, según sea apropiado, dependiendo de la presencia o ausencia de un adyuvante. Los ejemplos de dicho adyuvante incluyen un adyuvante completo de Freund (FCA), un adyuvante

incompleto de Freund (FIA) y un adyuvante de hidróxido de aluminio. Puede llevarse a cabo inmunización principalmente inyectando el antígeno en la vena, la almohadilla plantar, hipodermis o cavidad abdominal de un animal. Además, el intervalo de inmunización no está particularmente limitado y la inmunización se lleva a cabo a intervalos de varios días a varias semanas, preferentemente a intervalos de 1 semana, 1 a 10 veces y preferentemente 2 o 3 veces. De tres a siete días después del último día de inmunización, un título de anticuerpo se mide mediante inmunoensayo enzimático (ELISA o EIA), radioinmunoensayo (RIA) u otros métodos. En la fecha en que se obtiene un título de anticuerpo deseado, se puede recoger sangre para obtener antisuero. En el método descrito anteriormente para recoger un anticuerpo, si es necesario purificar el anticuerpo, el anticuerpo puede purificarse seleccionando un método adecuado a partir de métodos conocidos, tales como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de afinidad, o combinando los métodos mencionados anteriormente, según sea adecuado. A continuación, la reactividad de un anticuerpo policlonal en el antisuero se mide mediante el método de ELISA o similar.

(3) Producción de anticuerpo monoclonal

(3-1) Recogida de células productoras de anticuerpos

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

El antígeno preparado se administra a un mamífero, tal como una rata, un ratón o un conejo, para inmunización. La dosis del antígeno por animal se puede determinar, según sea apropiado, dependiendo de la presencia o ausencia de un adyuvante. Los mismos adyuvantes descritos anteriormente se pueden usar en el presente documento. Además, los mismos métodos de inmunización que se han descrito anteriormente se pueden aplicar en el presente documento. De uno a sesenta días y, preferentemente, de uno a catorce días después del último día de vacunación, se recogen células productoras de anticuerpos. Los ejemplos de dichas células productoras de anticuerpos incluyen células esplénicas, células de ganglios linfáticos y células de sangre periférica. De estas, son preferibles células de ganglios linfáticos y células esplénicas.

(3-2) Fusión celular

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

Los ejemplos de células de mieloma incluyen líneas celulares de mieloma de ratón tales como P3-X63-Ag8.653, P3-X63-Ag8(X63), P3-X63-Ag8.U1(P3U1), P3/NS I/1-Ag4-1(NS1) y Sp2/0-Ag14(Sp2/0). Se pueden seleccionar células de mieloma, teniendo en cuenta la compatibilidad con células productoras de anticuerpos, según sea adecuado.

Posteriormente, las células de mieloma se fusionan con células productoras de anticuerpos. Para dicha fusión celular, las células productoras de anticuerpos (1×10^6 a 1×10^7 células/ml) se mezclan con células de mieloma (2×10^5 a 2×10^6 células/ml) en un medio para células animales, tales como DMEM o un medio RPMI-1640 que no contiene suero. La relación celular entre las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma (células productoras de anticuerpos: células de mieloma) no está limitada. En general, la relación celular es preferentemente de 1:1 a 10:1 y más preferentemente 3:1. A continuación, se lleva a cabo una reacción de fusión en presencia de un promotor de fusión celular. Como tal promotor de fusión celular, puede usarse polietilenglicol que tiene un peso molecular medio de 1.000 a 6.000 Dalton (D) o similares. Además, también es posible fusionar células productoras de anticuerpos con células de mieloma, empleando un aparato de fusión celular disponible en el mercado que utiliza estimulación eléctrica (por ejemplo, electroporación).

(3-3) Selección y clonación de hibridomas

Los hibridomas de interés se seleccionan de las células después del tratamiento de fusión celular. Como método de selección de hibridomas, la suspensión celular se diluye de manera adecuada con, por ejemplo, un medio RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal, y la solución diluida se dispersa después en una placa de microtitulación. A continuación, se añade un medio selectivo a cada pocillo. Mientras que el medio selectivo se intercambia de manera adecuada con uno nuevo, se lleva a cabo el cultivo. Como resultado, aproximadamente 14 días después del inicio del cultivo en el medio selectivo, se pueden obtener células que crecen a partir del medio selectivo como hibridomas.

Posteriormente, se lleva a cabo exploración para examinar si un anticuerpo que reacciona con hTROP-2 está presente o no en un sobrenadante de cultivo de los hibridomas en crecimiento. La exploración de hibridomas se puede llevar a cabo según un método corriente y, por tanto, el método de exploración no está particularmente limitado. Por ejemplo,

se recoge una alícuota del sobrenadante de cultivo de los hibridomas en crecimiento contenidos en el pocillo y después se lleva a cabo exploración mediante ELISA, EIA, RIA o similares.

La clonación de las células fusionadas se puede llevar a cabo mediante un método de dilución limitante o similar. Un anticuerpo que muestra alta reactividad con hTROP-2 se determina mediante citometría de flujo o similar y después se selecciona un hibridoma que produce este anticuerpo. El hibridoma seleccionado se establece como un clon.

(3-4) Recogida de anticuerpo monoclonal

Como método para cultivar el hibridoma establecido y después recoger un anticuerpo monoclonal del cultivo obtenido, se puede adoptar un método habitual de cultivo celular, un método de formación de ascitis o similares. El término "cultivo" se usa en el presente documento para indicar que se permite que crezcan hibridomas en una placa de cultivo o un frasco de cultivo, o que se permite que crezcan hibridomas en la cavidad abdominal de un animal, como se describe a continuación.

En el caso del método de cultivo celular, los hibridomas se cultivan en un medio para células animales, tal como un medio RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal al 10 %, un medio MEM o un medio sin suero, en condiciones de cultivo habituales (por ejemplo, 37 °C, concentración de CO_2 del 5 %) durante 7 a 14 días y, a continuación, se puede obtener un anticuerpo del sobrenadante de cultivo.

En el caso del método de formación de ascitis, se administran aproximadamente 1 x 10^7 hibridomas en la cavidad abdominal de un animal de la misma especie que el mamífero del que se obtienen las células de mieloma, de modo que se permite que proliferen grandes cantidades de hibridomas. A continuación, de 2 a 3 semanas después, se recoge preferentemente ascitis.

En los métodos de recogida de anticuerpos descritos anteriormente, si es necesario purificar el anticuerpo, el anticuerpo puede purificarse seleccionando de manera apropiada un método adecuado a partir de métodos conocidos, tales como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel y de afinidad, o combinando los métodos mencionados anteriormente.

(3-5) Selección de clon que tiene actividad antitumoral

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

La expresión "actividad antitumoral" se usa en el presente documento para indicar la actividad de destruir células tumorales (células cancerosas) o la actividad de inhibir el crecimiento tumoral. Los ejemplos preferidos de dicha actividad antitumoral incluyen la actividad de inhibir el crecimiento de células cancerosas y la actividad de inhibir la angiogénesis tumoral. El tipo de tumor humano (células tumorales), en el que el anticuerpo de la presente invención puede presentar actividad antitumoral, incluye diversos tipos de tumores humanos conocidos, en los que se ha confirmado la expresión de hTROP-2. El tipo de dicho tumor humano no está particularmente limitado. Por ejemplo, uno o dos o más tipos seleccionados de diversos tumores humanos tales como cáncer de páncreas humano, cáncer de próstata humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de ovario humano, cáncer de pulmón humano y cáncer del conducto biliar humano son preferibles; y uno o dos o más tipos seleccionados de cáncer de páncreas humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de próstata humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de ovario humano y cáncer de pulmón humano son más preferibles. El cáncer de páncreas humano y/o cáncer colorrectal humano son más preferibles.

Por otra parte, el tumor descrito anteriormente puede ser un cáncer recidivante o un cáncer metastásico. El anticuerpo de la presente invención también puede presentar excelente actividad antitumoral en estos tipos de tumores.

La presencia de actividad antitumoral *in vivo* puede confirmarse, por ejemplo, empleando un ratón portador de tumores (un modelo de xenoinjerto de ratón), en cuya hipodermis se han trasplantado células tumorales deseadas, y administrando después el anticuerpo como se ha obtenido anteriormente al ratón. En este caso, el anticuerpo puede administrarse inmediatamente después del trasplante de células tumorales (modelos de prevención). Como alternativa, se puede administrar después de confirmar que el tumor trasplantado ha alcanzado un volumen predeterminado (modelos de tratamiento). El método de administración no está limitado. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse una vez cada tres días, cada semana, cada diez días o cada dos semanas, o mediante una sola administración (solo una vez), a una dosis de 5 a 20 mg/kg de peso corporal, mediante administración intraperitoneal o similares. En el caso de los modelos de prevención, la presencia o ausencia de actividad antitumoral y el nivel de la misma pueden evaluarse basándose en la frecuencia de formación de tumores y el volumen tumoral. En el caso de modelos de tratamiento, la presencia o ausencia de actividad antitumoral y el nivel de la misma pueden evaluarse basándose en el volumen tumoral.

El anticuerpo anti-hTROP-2 que tiene actividad antitumoral *in vivo* en la presente invención es un anticuerpo en el que las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de cadena H del mismo se muestran en las SEQ ID NO: 36 a 38, respectivamente, y/o las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de cadena L del mismo se

muestran en las SEQ ID NO: 41 a 43, respectivamente. Un ejemplo preferido de la región V de cadena H es una región V de cadena H que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 35. Un ejemplo preferido de la región V de cadena L es una región V de cadena L que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 40.

En la presente invención, más específicamente, un ejemplo preferido de un anticuerpo anti-hTROP-2 que tiene actividad antitumoral *in vivo* es un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (nombre del clon: K5-70) producido por un hibridoma con el número de referencia FERM BP-11251.

En el presente documento, el hibridoma con el número de referencia FERM BP-11251 se denominó "hibridoma de ratón-ratón K5-70" y se depositó el 12 de mayo de 2010; el hibridoma con el número de referencia FERM BP-11252 se denominó "hibridoma de ratón-ratón K5-107" y se depositó el 12 de mayo de 2010; el hibridoma con el número de referencia FERM BP-11253 se denominó "hibridoma de ratón-ratón K5-116-2-1" y se depositó el 12 de mayo de 2010; el hibridoma con el número de referencia FERM BP-11346 se denominó "hibridoma de ratón-ratón T6-16" y se depositó el 1 de marzo de 2011; y el hibridoma con el número de referencia FERM BP-11254 se denominó "hibridoma de ratón-ratón T5-86" y se depositó el 12 de mayo de 2010. Todos estos hibridomas fueron depositados en el Depositario Internacional de Organismos de Patentes (IPOD), el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, una institución administrativa independiente dependiente del Ministerio de Economía, Comercio e Industria (el AIST, Tsukuba Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japón, código postal: 305-8566).

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

El tipo de epítopo (un determinante antigénico) del anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención no está limitado, siempre que sea al menos una parte de hTROP-2 como antígeno. Por ejemplo, dicho epítopo es preferentemente al menos una porción de una región formada al retirar una región que consiste en aminoácidos en las posiciones 252 a 260 de la secuencia de aminoácidos de hTROP-2 mostrada en la SEQ ID NO: 2, más preferentemente al menos una porción de una región que consta de aminoácidos en las posiciones 1 a 69 o al menos una porción de una región que consta de aminoácidos en las posiciones 100 a 274 (excepto una región que consta de aminoácidos en las posiciones 252 a 260) y más preferentemente al menos una porción de una región que consta de aminoácidos en las posiciones 27 a 69 o una región que consta de aminoácidos en las posiciones 109 a 206. Los ejemplos particularmente preferidos del epítopo descrito anteriormente incluyen una región que consta de aminoácidos en las posiciones 43 a 65, una región que consta de aminoácidos en las posiciones 152 a 165, una región que consta de aminoácidos en las posiciones 171 a 183, una región que consta de aminoácidos en las posiciones 109 a 120, una región que consta de aminoácidos en las posiciones 193 a 206, una región que consta de aminoácidos en las posiciones 43 a 56 y una porción que comprende dicha región, en la secuencia de aminoácidos de hTROP-2 mostrada en la SEQ ID NO: 2. Otros ejemplos particularmente preferidos incluyen una región que consta de aminoácidos en las posiciones 43 a 65, una región que consta de aminoácidos en las posiciones 152 a 165, una región que consta de aminoácidos en las posiciones 171 a 183, una región que consta de aminoácidos en las posiciones 109 a 120 y una porción que comprende dicha región. Un anticuerpo anti-hTROP-2, que reconoce las regiones descritas anteriormente (se une a las regiones o porciones descritas anteriormente que comprenden dichas regiones), tiene alta actividad de internalización en células tumorales, por ejemplo, y por tanto es extremadamente útil como inmunoconjugado como se describe posteriormente.

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

Como se ha descrito anteriormente, el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención es un anticuerpo que tiene alta actividad antitumoral *in vivo* a una dosis baja. Específicamente, es preferible que el presente anticuerpo anti-hTROP-2 presente actividad inhibidora del crecimiento tumoral de 50 % o más (preferentemente 80 % o más, más preferentemente 90 % o más, aún más preferentemente 95 % o más y en particular preferentemente casi 100 % (por ejemplo, 98 % o más o 99 % o más)) a una dosis (como anticuerpo desnudo) de 20 mg/kg de peso corporal o menos (preferentemente 10 mg/kg de peso corporal o menos, más preferentemente 5 mg/kg de peso corporal o menos y aún más preferentemente 1 mg/kg de peso corporal o menos) con respecto a un modelo animal portador de tumores.

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

> Actividad inhibidora del crecimiento tumoral (%) = 100 - [(volumen tumoral o peso tumoral del grupo de administración de anticuerpos) / (volumen tumoral o peso tumoral del grupo de control)] x 100

Además, el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención tiene preferentemente actividad antitumoral en dos o más tipos de líneas celulares tumorales humanas. El tipo de dicha línea celular tumoral humana no está limitado. Por ejemplo, dichas líneas celulares tumorales humanas son al menos dos tipos seleccionados del grupo que consiste en diversos tipos de líneas celulares de cáncer de páncreas humano, líneas celulares de cáncer de próstata humano, líneas celulares de cáncer colorrectal humano, líneas celulares de cáncer de mama humano, líneas celulares de cáncer de ovario humano, líneas celulares de cáncer de pulmón humano y líneas celulares de cáncer de conducto biliar humano. Específicamente, los ejemplos preferidos de dichas líneas celulares tumorales humanas incluyen al menos

dos tipos seleccionados del grupo que consiste en una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59, una línea celular de cáncer de páncreas humano BxPC-3, una línea celular de cáncer de páncreas humano KP-3L, una línea celular de cáncer de páncreas humano KP-2, una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-1, una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-45H, una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-45P, una línea celular de cáncer de páncreas humano TCC-PAN2, una línea celular de cáncer de páncreas humano SUIT-2, una línea celular de cáncer de colon humano CACO-2, una línea celular de cáncer de colon humano SW480, una línea celular de cáncer de colon humano DLD-1, una línea celular de cáncer de colon humano HCT 116, una línea celular de cáncer de mama humano JIMT-1, una línea celular de cáncer de mama humano HCC1143, una línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, una línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468, una línea celular de cáncer de próstata humano DU145, una línea celular de cáncer de próstata humano PC-3, una línea celular de cáncer de ovario humano SK-OV-3, una línea celular de cáncer de pulmón humano Calu-3 y una línea celular de cáncer de conducto biliar humano TFK-1. De estas, como los dos o más tipos de líneas celulares tumorales humanas descritos anteriormente, al menos dos tipos seleccionados del grupo que consiste en la línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59, la línea celular de cáncer de páncreas humano BxPC-3, la línea celular de cáncer de colon humano SW480, la línea celular de cáncer de pulmón humano Calu-3, la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 y la línea celular de cáncer de ovario humano SK-OV-3 son más preferibles.

Por otra parte, el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención tiene una constante de disociación (valor Kd) de preferentemente 1,0 x 10^{-10} M o menos, más preferentemente 1,0 x 10^{-11} M o menos y más preferentemente 1,0 x 10^{-12} M o menos. En el presente documento, la capacidad de unión (afinidad) del anticuerpo se puede medir en forma de una constante de disociación (valor Kd), una constante de velocidad de disociación (Kdis [1/s]) o una constante de velocidad de asociación (Kas [1/M.s]), por ejemplo, por análisis de Scatchard o sensor de resonancia de plasmón superficial denominado Biacore. Como dichos aparatos Biacore, se pueden usar Biacore 3000, Biacore 2000, Biacore X, Biacore J y Biacore Q (todos los cuales fueron fabricados por Biacore), por ejemplo. Es preferible que el anticuerpo tenga una constante de disociación (valor Kd) que sea lo más pequeña posible porque podría tener alta capacidad de unión (afinidad). El valor de Kd se determina basándose en los dos parámetros de Kdis y Kas y se puede expresar en la fórmula: Kd[M] = Kdis/Kas. Como método para calcular el valor de Kd, puede adoptarse preferentemente el método descrito en los Ejemplos como se describe posteriormente (específicamente, el Ejemplo 10).

(4) Anticuerpo genéticamente recombinante y fragmento de anticuerpo

(4-1) Anticuerpo genéticamente recombinante

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

Un anticuerpo quimérico (es decir, un anticuerpo quimérico humanizado) es un anticuerpo formado al ligar (conjugar) la región variable de un anticuerpo procedente de ratón con la región constante de un anticuerpo procedente de ser humano (consúltese Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81,6851-6855, (1984), etc.). Cuando se produce dicho anticuerpo quimérico, el anticuerpo ligado de este modo puede construirse fácilmente mediante una técnica de recombinación genética.

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

En el presente documento, las secuencias de aminoácidos de CDR procedentes del ratón, que pueden usarse en el anticuerpo anti-hTROP-2 humanizado de la presente invención, son las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 36 a 38 como las CDR 1 a 3 de la región V de cadena H (VH), respectivamente. Las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 41 a 43 se usan como las CDR 1 a 3 de la región V de cadena L (VL), respectivamente.

Además, la secuencia de aminoácidos de una región V de cadena H en una región variable humana reconstruida humanizada incluye: la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 92 (que comprende CDR 1 a 3 que consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 36 a 38; la secuencia de aminoácidos que comprende además un péptido señal se muestra en la SEQ ID NO: 75); o la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 98 (que comprende CDR 1 a 3 que consiste en las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 36 a 38; la secuencia de aminoácidos que comprende además un péptido señal se muestra en la SEQ ID NO: 97).

De forma análoga, la secuencia de aminoácidos de una región V de cadena L en una región variable humana reconstruida humanizada es la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 93 (que comprende CDR 1 a 3 que consiste en las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 41 a 43; y la secuencia de aminoácidos que comprende además un péptido señal se muestra en la SEQ ID NO: 77).

En el presente documento, los ejemplos preferidos del anticuerpo anti-hTROP-2 humanizado de la presente invención incluyen: (i) un anticuerpo anti-hTROP-2 humanizado, en el que la secuencia de aminoácidos de la región V de cadena H se muestra en la SEQ ID NO: 92 y la secuencia de aminoácidos de la región V de cadena L se muestra en la SEQ ID NO: 93; y (ii) un anticuerpo anti-hTROP-2 humanizado, en el que la secuencia de aminoácidos de la región V de cadena H se muestra en la SEQ ID NO: 98 y la secuencia de aminoácidos de la región V de cadena L se muestra en la SEQ ID NO: 93. En particular, el anticuerpo anti-hTROP-2 humanizado descrito en (ii) anterior, en el cual la secuencia de aminoácidos de la región V de cadena H se muestra en la SEQ ID NO: 98, tiene una avidez mejorada (esto es flexibilidad del movimiento de dos brazos de unión a antígeno) y tiene alta actividad de unión a antígeno y, por lo tanto, este anticuerpo es particularmente preferible.

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

En el caso del anticuerpo quimérico mencionado anteriormente, anticuerpo humanizado y anticuerpo humano, la cadena de azúcar unida a N-glucósido en la región Fc de anticuerpo es preferentemente una cadena de azúcar, en el que la fucosa no se une a la N-acetilglucosamina en el terminal reductor de la misma. Un ejemplo específico es un anticuerpo que consiste en moléculas de anticuerpos genéticamente recombinantes, que tiene, en la región Fc de las moléculas de anticuerpos, una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa no se une a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el terminal reductor de la cadena de azúcar unida a N-glucósido a través de un enlace α. Dicho anticuerpo es capaz de mejorar significativamente la actividad ADCC. Este punto (las características de la cadena de azúcar unida a N-glucósido en la región Fc del anticuerpo) es preferible también para el anticuerpo policlonal y el anticuerpo monoclonal mencionados anteriormente.

(4-2) Fragmento de anticuerpo

El fragmento de anticuerpo anti-hTROP-2 (fragmento parcial) de la presente invención se incluye en el anticuerpo de la presente invención y comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 92 o 98 y la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 93. En el presente documento, el fragmento de anticuerpo de la presente invención tiene actividad de unión a hTROP-2 (concretamente, puede unirse a hTROP-2) y también tiene actividad antitumoral *in vivo,* como en el caso del anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención.

El fragmento del anticuerpo significa una región de una porción de un anticuerpo policlonal anti-hTROP-2 o anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (es decir, un fragmento de anticuerpo procedente del anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención). Los ejemplos de dicho fragmento de anticuerpo incluyen péptidos que comprenden, como al menos una parte del mismo, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv (fragmento variable de anticuerpo), un anticuerpo monocatenario (una cadena H, una cadena L, una región V de cadena H y una región V de cadena L, etc.), scFv, diacuerpo (dímero scFv), dsFv (una región V estabilizada con disulfuro) y una región determinante de complementariedad (CDR).

Fab es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 50.000 que tiene actividad de unión a antígeno, que se forma uniendo aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H a toda la cadena L a través de un enlace disulfuro, entre fragmentos obtenidos al tratar moléculas de anticuerpos con una proteasa, papaína. Además, también es posible producir dicho Fab insertando ADN que codifica el Fab de un anticuerpo en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota e introduciendo después el vector en un procariota o un eucariota para permitir que el ADN se exprese en el mismo.

$F(ab')_2$ es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 100.000 que tiene actividad de unión a antígeno, cuyo tamaño es ligeramente mayor que Fab que se une a Fab a través de enlace disulfuro en la región de bisagra, entre fragmentos obtenidos al tratar moléculas de anticuerpos con una proteasa, pepsina. Además, también es posible producir dicho $F(ab')_2$ por el enlace tioéter o enlace disulfuro de Fab, como se describe

posteriormente.

Fab' es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 50.000 que tiene actividad de unión a antígeno, que se forma escindiendo el enlace disulfuro en la región de bisagra del $F(ab')_2$ mencionado anteriormente. Además, también es posible producir dicho Fab' insertando ADN que codifica el fragmento Fab' de un anticuerpo en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota e introduciendo después el vector en un procariota o un eucariota para permitir que el ADN se exprese en el mismo.

scFv es un fragmento de anticuerpo que tiene actividad de unión a antígeno, que es un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH formado ligando una única región V de cadena H (VH) a una única región V de cadena L (VL) usando un conector peptídico (P) adecuado. Dicho scFv puede producirse obteniendo ADNc que codifica el VH y VL de un anticuerpo, construyendo ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota e introduciendo después el vector en un procariota o un eucariota para permitir que el ADN se exprese en el mismo.

El diacuerpo es un fragmento de anticuerpo formado por dimerización de scFv, que tiene actividades de unión a antígeno divalentes. Dichas actividades de unión a antígeno divalentes pueden ser idénticas entre sí o también pueden ser diferentes entre sí. Dicho diacuerpo puede producirse obteniendo ADNc que codifica el VH y VL de un anticuerpo, construyendo ADN que codifica scFv de modo que la longitud de la secuencia de aminoácidos de P sea de 8 restos o menos, insertando el ADN en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota e introduciendo después el vector en un procariota o un eucariota para permitir que el ADN se exprese en el mismo.

dsFv es un fragmento de anticuerpo formado uniendo polipéptidos, en los que un resto de aminoácido en cada uno de VH y VL se ha sustituido con un resto de cisteína, entre sí a través de un enlace disulfuro entre los restos de cisteína. El resto de aminoácido para sustituir con restos de cisteína puede seleccionarse basándose en la estimación de la estructura tridimensional del anticuerpo según el método de Reiter *et al*. (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994). Dicho dsFv puede producirse obteniendo ADNc que codifica el VH y VL de un anticuerpo, construyendo ADN que codifica dsFv, insertando el ADN en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota e introduciendo después el vector en un procariota o un eucariota para permitir que el ADN se exprese en el mismo.

Los ejemplos de un péptido que comprende una CDR incluyen un péptido que comprende todas las CDR de VH y un péptido que comprende todas las CDR de VL. Un ejemplo preferido del péptido es un péptido que comprende todas las CDR de VH y VL (6 regiones totales). La secuencia de aminoácidos de dicha CDR son las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 36 a 38 y 41 a 43, como se ha descrito anteriormente. Un péptido que comprende múltiples CDR puede unirse entre sí, directamente o mediante un conector peptídico adecuado. Dicho péptido que comprende CDR puede producirse construyendo ADN que codifica el VH y VL de un anticuerpo, insertando el ADN en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota e introduciendo después el vector de expresión en un procariota o un eucariota para permitir que el ADN se exprese en el mismo. Por otra parte, dicho péptido que comprende CDR también puede producirse mediante métodos de síntesis química tales como un método de Fmoc (un método de fluorenilmetiloxicarbonilo) y un método de tBoc (un método de t-butiloxicarbonilo).

El fragmento de anticuerpo de la presente invención, tal cual, puede ser un fragmento de anticuerpo, que comprende una parte o la región completa de Fc de anticuerpo en la que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el terminal reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido. De otro modo, el fragmento de anticuerpo de la presente invención también puede ser una proteína de fusión, en el que el fragmento de anticuerpo mencionado anteriormente se fusiona con una parte o la totalidad de la región Fc de anticuerpo en la que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el terminal reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido. Dicho fragmento de anticuerpo es capaz de mejorar significativamente la actividad ADCC y por tanto es preferible.

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

3. Polinucleótido, vector recombinante y transformante

En la presente invención, también se puede proporcionar un polinucleótido (un gen, ADN) que codifica el anticuerpo anti-hTROP-2 descrito anteriormente de la presente invención o un fragmento de anticuerpo del mismo. Específicamente, el presente polinucleótido es preferentemente un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cada secuencia de aminoácidos ejemplificada como el anticuerpo anti-hTROP-2 descrito anteriormente de la presente invención o un fragmento de anticuerpo del mismo. Por otra parte, el polinucleótido de la presente invención puede ser un polinucleótido que consiste en un polinucleótido solo que codifica el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención o un fragmento de anticuerpo del mismo o un polinucleótido que comprende el presente polinucleótido como una porción del mismo y también comprende secuencias de nucleótidos conocidas necesarias para expresión génica (por ejemplo, un promotor de la transcripción, una secuencia SD, una secuencia de Kozak, un terminador, etc.). Por tanto, el tipo del presente polinucleótido no está limitado.

Con respecto al polinucleótido que codifica el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención o un fragmento de

anticuerpo del mismo, el codón correspondiente a aminoácidos individuales después de la traducción no está particularmente limitado. El polinucleótido puede comprender ADN nucleotídico que muestra un codón usado habitualmente en mamíferos tales como un ser humano (preferentemente, un codón usado frecuentemente) o también puede comprender ADN nucleotídico que muestra un codón usado habitualmente en microorganismos tales como *Escherichia coli* o levadura, plantas y similares (preferentemente, un codón usado frecuentemente).

En la presente invención, también se puede proporcionar un vector recombinante que comprende el polinucleótido descrito anteriormente de la presente invención o un transformante que comprende el vector recombinante.

Un promotor de la transcripción, una secuencia SD (en un caso en el que el hospedador es una célula procariota) y una secuencia de Kozak (en un caso en el que el hospedador es una célula eucariota) pueden ligarse previamente a la cadena arriba de un polinucleótido (un gen, ADN) para incorporar en un vector de expresión usado como un vector recombinante. Por otra parte, un terminador puede estar ligado a la cadena abajo del polinucleótido. Asimismo, un potenciador, una señal de corte y empalme, una señal de poli(A) adicional, un marcador selectivo y similares también pueden ligarse al polinucleótido. Elementos individuales necesarios para la expresión génica, tales como el promotor de la transcripción descrito anteriormente, pueden estar comprendidos en el presente polinucleótido desde el principio. Cuando estos elementos están originalmente comprendidos en un vector de expresión, pueden utilizarse. Por tanto, el uso de elementos individuales no está particularmente limitado.

Como métodos para incorporar el presente polinucleótido en un vector de expresión, pueden adoptarse diversos tipos de métodos que utilizan técnicas conocidas de recombinación genética, tales como un método que usa enzimas de restricción o un método que usa topoisomerasa. El tipo de un vector de expresión no está limitado, siempre que sea capaz de conservar un polinucleótido (un gen, ADN) que codifica el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención o un fragmento de anticuerpo del mismo y se puede seleccionar un vector adecuado para células hospedadoras para usar, según sea apropiada, y puede utilizarse. Los ejemplos de dicho vector de expresión incluyen ADN plasmídico, ADN de bacteriófago, ADN de retrotransposón, un vector de retrovirus y ADN cromosómico artificial.

Posteriormente, el vector recombinante construido de este modo se introduce en un hospedador para obtener un transformante y después se cultiva el transformante obtenido, para que se pueda expresar el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención o un fragmento de anticuerpo del mismo. Debe observarse que el término "transformante" se usa en la presente invención para indicar un hospedador en el que se ha introducido un gen extraño. Los ejemplos de dicho transformante incluyen: un hospedador en el que se ha introducido un gen extraño mediante introducción de ADN plasmídico o similar (transformación); y un hospedador en el que se ha introducido un gen extraño infectando el hospedador con diversos tipos de virus y fagos (transducción).

El tipo de un hospedador no está limitado, siempre que sea capaz de expresar el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención o un fragmento de anticuerpo del mismo, después de que el vector recombinante descrito anteriormente se haya introducido en el hospedador. Por tanto, se puede seleccionar un hospedador, según sea adecuado. Los ejemplos de dicho hospedador incluyen hospedadores conocidos, tales como diversos tipos de células animales, tales como un ser humano o un ratón, y diversos tipos de células vegetales, bacterias, levaduras y células vegetales.

Cuando se usan células animales como células hospedadoras, los ejemplos de dichas células animales incluyen: fibroblastos humanos, células de riñón embrionario humano, células HEK293, células 293F, células CHO, células COS-7 de mono, Vero, células L de ratón, GH3 de rata y células FL humanas. Por otra parte, también pueden usarse células de insecto tales como células Sf9 o células Sf21 como células hospedadoras.

Cuando se usan bacterias como hospedadores, los ejemplos de dichas bacterias incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis.*

Cuando se usa levadura como un hospedador, los ejemplos de dichas levaduras incluyen *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe.*

Cuando se usan células vegetales como células hospedadoras, por ejemplo, se usan células BY-2 de tabaco. El método para obtener un transformante no está limitado y se puede seleccionar, según sea apropiado, teniendo en cuenta una combinación del tipo de un hospedador y el tipo de un vector de expresión. Los ejemplos preferidos del método para obtener un transformante incluyen electroporación, lipofección, un método de choque térmico, PEG, un método de fosfato de calcio, un método de DEAE dextrano y un método para infectar un hospedador con diversos tipos de virus, tales como virus de ADN o virus de ARN.

En el transformante obtenido, el tipo de codón de un polinucleótido contenido en un vector recombinante comprendido puede ser idéntico o diferente al tipo de codón de un hospedador usado. Por tanto, el tipo de codón no está limitado.

4. Preparación del conjugado de anticuerpo-fármaco

Como un inmunoconjugado preparado usando el anticuerpo anti-hTROP-2 mencionado anteriormente de la presente

invención, puede proporcionarse un conjugado de anticuerpo-fármaco, que comprende el anticuerpo mencionado anteriormente y una sustancia (un compuesto, etc.) que tiene actividad antitumoral y/o actividad destructora de células. Debe observarse que un conjugado formado preparando previamente cada una de las moléculas de anticuerpo mencionadas anteriormente y la sustancia mencionada anteriormente que tiene actividad antitumoral y/o actividad destructora de células, por separado, y después combinándolos, se conoce en general como un inmunoconjugado. Por otro lado, un conjugado obtenido ligando una toxina proteica usada como tal sustancia que tiene actividad antitumoral y/o actividad destructora de células a un gen de anticuerpo en un gen según una técnica de recombinación genética, para permitir que se exprese como una proteína individual (una proteína de fusión), se conoce en general como una inmunotoxina.

Los ejemplos de una sustancia que tiene actividad antitumoral incluyen doxorrubicina, calicheamicina, mitomicina C, Auristatina E e isótopo radiactivo (IR). Los ejemplos de una sustancia que tiene actividad destructora de células incluyen saporina, lisina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina diftérica e isótopo radiactivo (IR). De estas, se utilizan preferentemente saporina y exotoxina de *Pseudomonas*. El tipo de IR que tiene actividad antitumoral y/o actividad destructora de células no está particularmente limitad y los ejemplos de dicho IR incluyen ^{90}Y, ^{111}In, ^{125}I, ^{3}H, ^{35}S, ^{14}C, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{189}Re, ^{177}Lu, ^{67}Cu, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{211}At, ^{198}Au, ^{224}Ac, ^{126}I, ^{133}I, ^{77}Br, ^{113m}In, ^{95}Ru, ^{97}Ru, ^{103}Ru, ^{105}Ru, ^{107}Hg, ^{203}Hg, ^{94m}Tc, ^{121m}Te, ^{122m}Te, ^{125m}Te, ^{165}Tm, ^{167}Tm, ^{168}Tm, ^{111}Ag, ^{197}Pt, ^{109}Pd, ^{32}P, ^{33}P, ^{47}Sc, ^{153}Sm, ^{177}Lu, ^{105}Rh, ^{142}Pr, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{166}Ho, ^{199}Au, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{51}Cr, ^{59}Fe, ^{18}F, ^{75}Se, $^{201}T1$, ^{225}Ac, ^{76}Br, ^{86}Y, ^{169}Yb, ^{166}Dy, ^{212}Pb y ^{223}Ra.

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

El anticuerpo anti-hTROP-2 mencionado anteriormente de la presente invención es excelente con respecto a actividad de internalización en células tumorales diana que expresan hTROP-2. Por tanto, combinando previamente una sustancia que tiene actividad antitumoral y actividad destructora de células con el anticuerpo anti-hTROP-2, se hace posible permitir que dicha sustancia actúe de forma directa y muy selectivamente sobre las células tumorales. El conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención es excelente con respecto a su capacidad para administrar el agente a las células tumorales diana.

La actividad de internalización en células puede evaluarse marcando de manera fluorescente un anticuerpo con rodamina o similar y observando después el comportamiento migratorio y la localización del anticuerpo usando un microscopio de fluorescencia o similar.

Por otra parte, en la presente invención, además del conjugado de anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente, también se puede proporcionar un conjugado de fragmento de anticuerpo-fármaco, en el que se usa el fragmento de anticuerpo mencionado anteriormente en lugar de un anticuerpo. Con respecto a los detalles de dicho conjugado de fragmento de anticuerpo-fármaco, se pueden aplicar las descripciones del conjugado de anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente, según sea adecuado.

En lo sucesivo en el presente documento, en las descripciones de la presente memoria descriptiva, dicho conjugado de fragmento de anticuerpo-fármaco también se incluye en el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención.

5. Composición farmacéutica

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

La composición farmacéutica es útil como composición farmacéutica para tratar y/o diagnosticar un tumor. En particular, ya que el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención y un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende el anticuerpo mencionado anteriormente tienen una excelente actividad inhibidora del crecimiento tumoral como dicha actividad antitumoral, se usan más preferentemente en el tratamiento de tumor. Es decir, el anticuerpo anti-hTROP-2 y el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención son útiles como principios activos contenidos en un agente terapéutico tumoral y un agente de diagnóstico tumoral. Debe observarse que el tratamiento del tumor descrito anteriormente incluye la inhibición del crecimiento tumoral y la supresión del crecimiento tumoral. Específicamente, si es un agente terapéutico tumoral, los ejemplos del agente terapéutico tumoral incluyen un inhibidor del crecimiento tumoral y un supresor del crecimiento tumoral.

Es preferible proporcionar la composición farmacéutica de la presente invención en forma de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-hTROP-2 y/o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención como principio(s) activo(s) y que comprende además un vehículo farmacológicamente aceptable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse en combinación con agentes antitumorales conocidos. Por dicho uso combinado, se puede obtener un mayor efecto antitumoral.

Las enfermedades diana (tumores), a las que se aplica la composición farmacéutica de la presente invención, incluyen: los diversos tipos de tumores humanos conocidos mencionados anteriormente, en los que se ha confirmado

previamente la expresión de hTROP-2. Entre otros, uno o dos o más tipos seleccionados de diversos tipos de tumores humanos tales como cáncer de páncreas humano, cáncer de próstata humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de ovario humano, cáncer de pulmón humano y cáncer del conducto biliar humano son preferibles. Dicha enfermedad diana puede ser una enfermedad única o se pueden desarrollar dos o más enfermedades en combinación. Por otra parte, el tumor diana puede ser un cáncer recidivante o un cáncer metastásico. La composición farmacéutica de la presente invención (además, el anticuerpo anti-hTROP-2 y/o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención) se puede usar eficazmente como agente terapéutico y agente de diagnóstico para un cáncer recidivante o un cáncer metastásico.

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

En particular, cuando un fragmento de anticuerpo procedente del anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención (en particular, un fragmento de anticuerpo con un peso molecular bajo) se administra en un cuerpo vivo, se puede usar un sistema de dispersión coloidal además de los componentes mencionados anteriormente. Se prevé que dicho sistema de dispersión coloidal tenga un efecto de mejora de la estabilidad de un compuesto (un fragmento de anticuerpo) en un cuerpo vivo o un efecto de transporte eficaz de dicho compuesto a un órgano, tejido o célula específico. El tipo de dicho sistema de dispersión coloidal no está limitado, siempre que se use habitualmente. Los ejemplos de dicho sistema de dispersión coloidal incluyen sistemas de dispersión que comprenden, como bases, polietilenglicol, un conjugado macromolecular, un agregado macromolecular, una nanocápsula, microesfera, perlas y lípidos, incluyendo un emulsionante de aceite en agua, micela, micela mixta y liposoma. Los ejemplos preferidos de dicho sistema de dispersión coloidal incluyen múltiples liposomas y las vesículas de membrana artificial, que tienen el efecto de transportar eficazmente dicho compuesto a un órgano, tejido o célula específico (Mannino *et al*., Biotechniques, 1988, 6, 682; Blume y Cevc, Biochem. et Biophys. Acta, 1990, 1029, 91; Lappalainen *et al*., Antiviral Res., 1994, 23, 119; Chonn y Cullis, Current Op. Biotech., 1995, 6, 698).

La dosificación de la composición farmacéutica de la presente invención difiere dependiendo de la edad, el sexo, el peso corporal y los síntomas de un paciente, los efectos terapéuticos, un método de administración, un tiempo de tratamiento, los tipos del anticuerpo anti-hTROP-2 y el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención contenidos en la composición farmacéutica, etc. En general, la presente composición farmacéutica puede administrarse dentro del intervalo entre 600 µg y 6.000 mg por adulto por administración. Sin embargo, la dosis no se limita al intervalo mencionado anteriormente.

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

La presente invención proporciona el anticuerpo anti-hTROP-2 mencionado anteriormente y/o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención para su uso en un método de tratamiento y/o diagnóstico de un tumor.

6. Método para detectar tumor

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

Como se ha descrito anteriormente, se ha confirmado que hTROP-2 se expresa específicamente en diversos tipos de células tumorales. Por tanto, hTROP-2 y, en particular, hTROP-2 libre (una porción de región extracelular de hTROP-

2) se puede usar como marcador para diversos tipos de tumores. En particular, dicho hTROP-2 puede usarse preferentemente como un marcador para el cáncer de páncreas humano, cáncer de próstata humano, cáncer colorrectal humano y cáncer de mama humano.

Por lo tanto, se permite que el anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención reaccione con una muestra biológica y después se detecta una señal del anticuerpo que ha reaccionado, para detectar un tumor. La señal de anticuerpo obtenida puede usarse como un indicador de la cantidad de un antígeno en la muestra biológica (es decir, una cantidad de hTROP-2 o una cantidad de hTROP-2 libre). En la detección de un tumor usando el anticuerpo de la presente invención, en primer lugar, se permite que una muestra biológica recogida como analito de un sujeto, tal como una sección tisular o sangre usada como diana de ensayo, se una al anticuerpo de la presente invención mediante una reacción de antígeno-anticuerpo. Posteriormente, basándose en los resultados de medición de la cantidad del anticuerpo unido, se mide la cantidad de un antígeno de interés contenido en la muestra biológica. Esta medición puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos de inmunoensayo conocidos. Por ejemplo, pueden usarse un método de inmunoprecipitación, un método de inmunoaglutinación, radioinmunoensayo, inmunonefelometría, un método de transferencia Western, citometría de flujo y similares. En el radioinmunoensayo, se usa un anticuerpo marcado y, por tanto, una señal de anticuerpo se expresa como la cantidad del anticuerpo marcado que se detecta de manera directa. De otro modo, puede usarse como una solución patrón un anticuerpo cuya concentración o título de anticuerpo se conoce y, por tanto, una señal del anticuerpo diana puede expresarse como un valor relativo. Es decir, tanto la solución patrón como el analito pueden medirse usando un dispositivo de medición y una señal de anticuerpo en una muestra biológica puede expresarse como un valor relativo al valor de la solución patrón usada como criterio. Los ejemplos de dicho radioinmunoensayo incluyen el método ELISA, el método EI, el método RIA, inmunoensayo de fluorescencia (FIA) e inmunoensayo de luminiscencia. De estos, el método ELISA es particularmente preferible porque es sencillo y muy sensible.

En la presente invención, el estado de un tumor puede evaluarse o diagnosticarse, usando el resultado de detección obtenido por el método de detección mencionado anteriormente como un indicador. Por ejemplo, cuando el resultado de la detección supera un valor convencional predeterminado, el estado de un tumor se define como tumor positivo y cuando el resultado de la detección es menor que el valor convencional predeterminado, se define como tumor negativo. En el caso de tumor positivo, se determina que se podría haber desarrollado un tipo de tumor determinado y, por tanto, se puede evaluar el estado del tumor. La expresión "el estado de un tumor" se usa en el presente documento para indicar la presencia o ausencia del desarrollo de un tumor o el grado de progresión del mismo. Por tanto, los ejemplos específicos del estado de un tumor incluyen la presencia o ausencia del desarrollo de un tumor, el grado de progresión del mismo, el grado de malignidad, la presencia o ausencia de metástasis y la presencia o ausencia de recidiva.

En la evaluación mencionada anteriormente, como estado de un tumor para evaluar, se puede seleccionar solo un estado de los ejemplos mencionados anteriormente o se pueden combinar y seleccionar múltiples ejemplos. La presencia o ausencia de un tumor puede evaluarse determinando si el tumor se ha desarrollado o no, en referencia al valor convencional predeterminado utilizado como límite, basándose en el resultado de detección obtenido. El grado de malignidad se usa como un indicador que indica el grado de progresión de un cáncer. Basándose en el resultado de detección, el tumor diana puede clasificarse en una etapa de enfermedad determinada y puede evaluarse. De otro modo, un cáncer temprano y un cáncer avanzado se pueden distinguir entre sí y después se pueden evaluar. Por ejemplo, también es posible determinar el tumor diana como un cáncer temprano o un cáncer avanzado, utilizando el resultado de detección como indicador. La metástasis del tumor puede evaluarse determinando si la neoplasia ha aparecido o no en un sitio aparte de la posición de la lesión inicial, utilizando el resultado de detección como indicador. La recidiva se puede evaluar determinando si el resultado de la detección ha superado o no el valor convencional predeterminado de nuevo después de la etapa de intervalo o la remisión.

7. Kit para detectar o diagnosticar tumor

El anticuerpo anti-hTROP-2 de la presente invención puede proporcionarse en forma de un kit para detectar o diagnosticar un tumor. El kit de la presente invención comprende una sustancia de marcaje, un reactivo en fase sólida en el que el anticuerpo o el anticuerpo marcado se ha inmovilizado, etc., así como el anticuerpo mencionado anteriormente. Una sustancia de marcaje que marca el anticuerpo significa una sustancia marcada con una enzima, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto quimioluminiscente, etc. El kit de la presente invención también puede comprender otros reactivos usados para llevar a cabo la detección de la presente invención, además de los elementos constitucionales mencionados anteriormente. Por ejemplo, cuando dicha sustancia de marcaje es una sustancia de marcaje enzimática, el kit de la presente invención puede comprender un sustrato enzimático (un sustrato cromogénico, etc.), una solución de disolución de sustrato enzimático, una solución de parada de reacción enzimática, un diluyente usado para analitos, etc. Por otra parte, el presente kit puede comprender además diversos tipos de tampones, agua esterilizada, diversos tipos de recipientes de cultivo celular, diversos tipos de reactores (un tubo Eppendorf, etc.), un agente de bloqueo (un componente sérico tal como albúmina sérica bovina (BSA), leche desnatada o suero de cabra), un agente de lavado, un tensioactivo, diversos tipos de placas, un antiséptico tal como azida de sodio, un manual de operación experimental (instrucciones), etc.

El kit de la presente invención puede usarse eficazmente para llevar a cabo el método de detección mencionado

anteriormente de la presente invención y, por tanto, es extremadamente útil.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá de manera más específica en los siguientes ejemplos. Sin embargo, no se pretende que estos ejemplos limiten el alcance de la presente invención.

[Ejemplo 1]

[Clonación del gen de hTROP-2]

Se aisló un gen de hTROP-2 de longitud completa de hígado fetal humano (embrión de 10 semanas de edad) según un método de RT-PCR. En primer lugar, los siguientes cebadores de PCR se diseñaron basándose en la secuencia de un gen de hTROP-2 (n.º de referencia de Genbank NM_ 002353).

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

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

Se construyó un vector de expresión escindiendo un fragmento EcoRI/XhoI que comprendía un gen de hTROP-2 de pCRII-hTROP-2 e insertando después el fragmento en el sitio *EcoRI/XhoI* de un vector pcDNA4/myc-His© (Invitrogen) (pcDNA4-hTROP-2-*myc*/His). Por otra parte, se cortó un fragmento *HindIII/PmeI* que comprendía un gen de hTROP-2 de pcDNA4-hTROP-2-*myc*/His (en donde la porción de escisión de *HindIII* tenía extremos romos) y después se insertó el fragmento en un sitio *PmeI* de un vector pcDNA3.1(+) (Invitrogen), para construir un vector de expresión que comprende un gen de resistencia a neomicina (pcDNA3.1-hTROP-2-*myc*/His).

[Ejemplo 2]

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

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

[Ejemplo 3]

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

Se amplificó un fragmento génico que codificaba una porción de la región extracelular de hTROP-2 (específicamente, una región que consta de aminoácidos en las posiciones 1 a 263 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2) mediante un método de PCR. Los siguientes cebadores se usaron en la amplificación.

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

En esta operación, se añadió una secuencia digerida con enzima de restricción *XhoI* al cebador inverso. El fragmento de ADN amplificado por el método de PCR se desarrolló mediante electroforesis en gel de agarosa y después se purificó usando el kit de extracción en gel QIAquick (marca registrada) (QIAGEN). El fragmento de ADN purificado se subclonó en un vector pCR Blunt (Invitrogen) (pCRB-hTROP-2 EC) y se confirmó la secuencia del gen. Posteriormente, se cortó un fragmento EcoRI/XhoI que comprendía el fragmento génico que codificaba la región extracelular de hTROP-2 del pCRB-hTROP-2 EC y después se insertó en el sitio *EcoRI/XhoI* de un vector pcDNA4/myc-His© A (Invitrogen) (pcDNA4mH-hTROP-2 EC). Además, para producir un sitio de escisión de enzima de restricción *NruI*, los siguientes oligonucleótidos se asociaron e insertaron en el sitio BamHI/EcoRI del pcDNA4mH-hTROP-2 EC.

Oligonucleótido 1: 5'-gatccactagtcgcgagtggtgg-3' (SEQ ID NO: 6)
Oligonucleótido 2: 5'-aattccaccactcgcgactagtg-3' (SEQ ID NO: 7)

De forma análoga, se insertó un conector pBgl II (TAKARA) en el sitio *PmeI* del pcDNA4mH-hTROP-2 EC (pcDNA4mH-NB-hTROP-2 EC). Para producir una proteína recombinante usando baculovirus, se cortó un fragmento *NruI/BglII* que comprendía el fragmento génico que codificaba la región extracelular de hTROP-2 del pcDNA4mH-NB-hTROP-2 EC

y después se insertó en el sitio *NruI/BglII* de un vector pPSC8 (Nosan Corporation) (pPSC8-hTROP-2 EC). La producción de la proteína recombinante de la región extracelular de hTROP-2 usando baculovirus se delegó a Nosan Corporation.

La proteína recombinante de la región extracelular de hTROP-2 se purificó de la siguiente manera. Se añadió Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Biosciences) a un sobrenadante de cultivo que comprendía la proteína recombinante, de modo que se les permitiera unirse entre sí a 4 °C durante 2 horas. A continuación, el resultante se lavó con un tampón de fosfato que contenía imidazol 20 mM, empleando EconoColumn (BIO RAD), y después se eluyó con un tampón de fosfato que contenía imidazol 300 mM, para que se purificara.

[Ejemplo 4]

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

Se aisló un gen de EpCAM humano de longitud completa de hígado fetal humano (embrión de 10 semanas de edad) según un método de RT-PCR. En primer lugar, los siguientes cebadores de PCR se diseñaron basándose en la secuencia de un gen de EpCAM humano (n.º de referencia de Genbank NM_002354).

Cebador directo: 5'-tcctcgtgtcccactcccgg-3' (SEQ ID NO: 8)
Cebador inverso: 5'-ctcgagtgcattgagttccctatgc-3' (SEQ ID NO: 9)

Cuando se diseñaron estos cebadores, se añadió una secuencia digerida por enzimas de restricción XhoI, excepto un codón de parada, al cebador inverso. El ADNc se sintetizó a partir de ARN total (TAKARA) de hígado fetal humano (embrión de 10 semanas de edad). Usando este ADNc como molde, se llevó a cabo una reacción de PCR con los cebadores mencionados anteriormente. A continuación, se llevó a cabo desarrollo por electroforesis en gel de agarosa y extracción de una banda de interés y después se clonó en un vector pCRII (Invitrogen) (pCRII-hEpCAM). El ADNc de EpCAM humano clonado se confirmó mediante secuenciación.

Se construyó un vector de expresión escindiendo un fragmento EcoRI/XhoI que comprendía un gen de EpCAM humano de pCRII-hEpCAM e insertando después el fragmento en el sitio EcoRI/XhoI de un vector pcDNA4/myc-His© A (Invitrogen) (pcDNA4-hEpCAM-*myc*/His). Por otra parte, se cortó un fragmento *HindIII/PmeI* que comprendía un gen de hEpCAM de pcDNA4-hEpCAM-*myc*/His (en donde la porción de escisión de *HindIII* tenía extremos romos) y después se insertó el fragmento en un sitio *PmeI* de un vector pcDNA3.1(+) (Invitrogen), para construir un vector de expresión que comprende un gen de resistencia a neomicina (pcDNA3.1-hEpCAM-*myc*/His).

[Ejemplo 5]

[Producción de anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2]

Como inmunógenos, se usaron líneas celulares capaces de expresar de manera estable hTROP-2 (células HEK293-hTROP-2, células CHO-K1-hTROP-2 y células 7E2-C-hTROP-2); línea celular de cáncer de páncreas humano que expresa de manera endógena una proteína hTROP-2 en la superficie celular (PK-59, RCB1901; obtenido del banco celular RIKEN); y la proteína recombinante de la región extracelular de hTROP-2 producida por el método descrito anteriormente.

En el caso de las líneas celulares capaces de expresar de forma estable hTROP-2, se usaron 1 x 10^7 células y en el caso de la proteína hTROP-2 recombinante, se usaron 20 µg de la proteína. Las líneas celulares o la proteína recombinante se mezclaron con un adyuvante TiterMax Gold (Funakoshi Corporation) en una relación de mezcla de 1:1, para preparar una emulsión. La emulsión se inyectó después en las dos almohadillas plantares o la cavidad abdominal de un ratón (C57/BL6, Balb/c) (inmunización inicial). Cuando la inmunización se llevó a cabo mediante inyección en las dos almohadillas plantares durante un corto periodo de tiempo, se llevó a cabo refuerzo de tres a diez días después de la inmunización inicial. El día siguiente a la inmunización final, se recogieron ganglios linfáticos de ambas rodillas y después se prepararon los linfocitos. Cuando la inmunización se llevó a cabo mediante inyección en la cavidad abdominal durante un largo periodo de tiempo, se llevaron a cabo refuerzos a intervalos de una vez por semana después de la inmunización inicial (en donde se llevaron a cabo refuerzos durante 1 a 2 meses). A continuación, se aislaron linfocitos B del bazo según un método corriente. En el caso de inmunización usando células como inmunógenos, se usó una suspensión celular que era PBS que contenía 5 x 10^6 células para refuerzos. En el caso de usar una proteína como inmunógeno, se usaron 5 µg de una solución de PBS.

Los linfocitos preparados se mezclaron con una línea celular de mieloma de ratón (P3-X63-Ag8.653) en una relación de mezcla de 3:1 y después se llevó a cabo fusión celular según un método de polietilenglicol. A continuación, las células fusionadas se cultivaron durante 7 a 28 días en un medio de metilcelulosa (nombre comercial: medio de clonación ClonaCell-HY D; Stem Cell), que contenía HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina). Se recogieron colonias individuales de hibridomas en crecimiento y se colocaron en una placa de fondo plano de 96 pocillos y usando un medio líquido selectivo que contenía HAT, los hibridomas se cultivaron en una incubadora de CO_2 al 5 %. Un sobrenadante de cultivo de hibridomas en crecimiento de colonias individuales se sometió a una exploración primaria

a través de ELISA celular (descrito más adelante) y después a una exploración secundaria a través de análisis FACS usando células HuH-7-hTROP-2, PK-59, estableciendo de este modo 300 tipos de hibridomas, que producen anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 que reconocen proteínas hTROP-2 expresadas en la superficie celular de células vivas.

[Ejemplo 6]

[Exploración primaria con ELISA celular]

Se inocularon como alternativa células CHO-K1 (control negativo de hTROP-2; obtenido de Japan Health Sciences Foundation) y células CHO-K1-hTROP-2 (o células HUH-7 (control negativo de hTROP-2; adquirido de la Japan Health Sciences Foundation) y células HuH-7-hTROP-2) en una placa de cultivo de 96 pocillos (BD Falcon) a una densidad celular de 3 x 10^4 células/pocillo y después las células se cultivaron en una atmósfera de CO^2 al 5 % a 37 °C durante 1 a 2 días. El medio de cultivo celular se retiró por decantación. A continuación, las células se lavaron con PBS helado y después se trataron con paraformaldehído-PBS al 4 % durante 5 minutos, de modo que las células fueran inmovilizadas. Las células se lavaron con PBS que se había enfriado en hielo y después se preparó una placa de ELISA. A continuación, se llevó a cabo ELISA según un método corriente. Los procedimientos específicos se describirán a continuación.

En primer lugar, se llevó a cabo bloqueo con una solución de leche desnatada-PBS al 2 % a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1 hora. Posteriormente, se añadió el sobrenadante de cultivo de hibridoma a las mismas y después se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, el resultante se lavó con una solución de Tween20-PBS al 0,1 % tres veces. Como anticuerpo secundario, se añadió al resultante anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (GE Healthcare Biosciences), que se había diluido 1000 veces con una solución de bloqueo, y después se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, el resultante se lavó con una solución de Tween20-PBS al 0,1 % tres veces. Se añadió una solución de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina: SIGMA) a la solución de reacción para llevar a cabo una reacción de color y después se terminó la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 1 M. A continuación, se midió la absorbancia (405 nm) usando un lector de microplacas modelo 550 (BIO RAD). Los hibridomas correspondientes a un sobrenadante de cultivo de hibridoma que presenta un alto valor de absorbancia para el control negativo se sometieron a un cultivo a gran escala en una placa de fondo plano de 24 pocillos y después se sometieron a una exploración secundaria usando análisis de FACS.

[Ejemplo 7]

[Exploración secundaria usando análisis de FACS]

Los hibridomas, que se determinaron positivos en la exploración primaria descrita anteriormente usando ELISA celular, se sometieron a una exploración secundaria usando análisis de FACS. En la evaluación de células de hibridoma, se usaron células Huh-7, que eran células de cáncer de hígado humano que no expresaban hTROP-2, como células de control negativo y la reactividad con células HuH-7-hTROP-2, que expresaban establemente hTROP-2, se usó como indicador. Después, la evaluación se llevó a cabo basándose en la reactividad con células PK-59 (RCB1901; obtenido del banco celular RIKEN), que eran células de cáncer de páncreas humano que expresaban de manera endógena una proteína hTROP-2 en la superficie celular.

Las células se eliminaron de la placa de cultivo mediante un tratamiento con tripsina y después se preparó una suspensión celular (densidad celular: 2 x 10^6 células/ml). El sobrenadante de cultivo de hibridoma, que presentó positivo en la exploración primaria usando ELISA celular, se hizo reaccionar con 100 µl de la suspensión celular a 4 °C durante 20 minutos. La mezcla de reacción se lavó con PBS y después se hizo reaccionar con IgG de ratón marcada con PE (BD Pharmingen) (0,1 µg) (4 ºC, 30 minutos). A continuación, la mezcla de reacción se analizó usando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

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

[Ejemplo 8]

[Identificación del isotipo]

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

[Ejemplo 9]

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

Los clones de hibridoma producidos por el método descrito anteriormente se administraron a una densidad de 3 x 10^6 clones en la cavidad abdominal de un ratón desnudo BALB/c, a los que se había administrado previamente 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (pristano) (siete días antes). Dos semanas después, se recogió ascitis. Por otra parte, esta ascitis se sometió a precipitación con ácido caprílico y después a purificación por afinidad usando una columna de proteína G (proteína G HiTrap; GE Healthcare Biosciences) o una columna de proteína A (proteína A HiTrap; GE Healthcare Biosciences), para obtener anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 de clones de hibridoma individuales.

[Ejemplo 10]

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

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

Específicamente, la proteína hTROP-2 recombinante purificada (0,1 µg/ml) se añadió a una placa de cultivo de 96 pocillos (Corning) de modo que la placa se revistió con el antígeno (a temperatura ambiente durante 1 hora, o a 4 °C durante una noche). Posteriormente, el resultante se lavó con PBS tres veces y después se añadió leche desnatada al 2 % (solución de PBS) para bloquearlo (a temperatura ambiente durante 1 hora). El resultante se lavó con PBS dos veces. A continuación, se añadió un complejo de antígeno-anticuerpo que se había formado previamente mezclando una solución de antígeno (una proteína hTROP-2 purificada; 50, 25, 12,5, 6,25 o 3,125 nM) con cada clon (0,5 nM) del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 y equilibrando después la mezcla, a la placa de ELISA descrita anteriormente y se hicieron reaccionar (a temperatura ambiente durante 1 hora). El producto de reacción se lavó con PBS tres veces y después se hizo reaccionar con anti-IgG de ratón marcado con HRP (concentración final: 1 µg/ml) (GE Healthcare Biosciences) diluido con una solución de bloqueo (a temperatura ambiente durante 1 hora). Posteriormente, el producto de reacción se lavó tres veces con una solución Tween20-PBS al 0,1 % y se añadió una solución de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina: SIGMA) al resultante para llevar a cabo una reacción de color. Después, se añadió ácido sulfúrico 1 M al producto de reacción para terminar la reacción. Usando el lector de microplacas modelo 550 (BIO RAD), se midió la absorbancia.

Se usaron las siguientes expresiones de cálculo para medir la constante de disociación (Kd).

De acuerdo con la ley de acción de masas, una reacción de antígeno-anticuerpo está representada por las siguientes expresiones.

$$\text{Ag (Antígeno)} + \text{Ab (Anticuerpo)} \underset{k2}{\overset{k1}{\Leftrightarrow}} \text{Ag-Ab (complejo de antígeno-anticuerpo)} \cdots\cdots(1)$$

$$Kd = k2/k1 = Agl \times Abl / Ag\text{-}Ab = Agl \times Abl/x \cdots\cdots(2)$$

En la expresión (2), Agl representa la concentración de un antígeno libre, Abl representa la concentración de un anticuerpo libre y Ag-Ab representa la concentración de un complejo de antígeno-anticuerpo. Si Ag-Ab = x, la concentración de anticuerpo libre está representada por la siguiente expresión.

$$Abl = Abt - x \cdots\cdots(3)$$

La expresión anterior (2) puede ser, por lo tanto,

$$Kd = Agl \times (Abt - x) / x \cdots\cdots(4)$$

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

$$x / Abt = Agl \times (1 - x/Abt) \times 1/Kd$$
$$x/Abt \times 1/Agl = (1 - x/Abt) \times 1/Kd \cdots\cdots(5)$$

Si X = x/Abt e Y = x/Abt × Agl en la expresión (5),

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

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

Los valores de Kd de los 300 clones de anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 generados se midieron mediante el método descrito anteriormente. Como resultado, hubo 133 clones que presentaron un valor de Kd de 1 × 10^{-10} (M) o menos, 59 clones que presentaron un valor de Kd de 1 × 10^{-11} (M) o menos y 2 clones que presentaron un valor de

Kd de 1 × 10^{-12} (M) o menos.

Entre los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2, que presentaban actividad inhibidora del crecimiento tumoral *in vivo,* se descubrió que los valores de Kd de K5-70 (IgG2a de ratón), T6-16 (IgG2a de ratón), K5-107 (IgG1 de ratón), K5-116-2-1 (IgG2a de ratón) y T5-86 (IgG1 de ratón) eran 6,8 × 10^{-12} (M), 4,3 × 10^{-12} (M), 4,7 × 10^{-12} (M), 2,69 × 10^{-11} (M) y 8,49 × 10^{-11} (M), respectivamente (Figura 1 y Tabla 1).

Tabla 1

Valores de Kd de anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2

Clon N.º	K5-70	T6-16	K5-107	K5-116-2-1	T5-86
Kd (× 10^{-12} M)	6,8	4,3	4,7	26,9	84,9

[Ejemplo 11]

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

Las líneas celulares de cáncer humano (líneas celulares de tumor humano) usadas en estos estudios fueron adquiridas del Banco de Recursos de Investigación en Ciencias de la Salud (HSRRB), Banco celular RIKEN (RIKEN), ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo), ECACC (Colección Europea de Cultivos Celulares) y DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares). Específicamente, se usaron las siguientes líneas celulares de cáncer.

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

Las células cancerosas se eliminaron de una placa de cultivo mediante un tratamiento con tripsina y después se preparó una suspensión celular (densidad celular: 2 x 10^6 células/ml). Se añadió un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (0,1 µg) a 100 µl de la suspensión celular y después se hicieron reaccionar a 4 °C durante 20 minutos. La solución de reacción se lavó con PBS y después se hizo reaccionar con anti-IgG de ratón marcado con PE (BD Biosciences Pharmingen) (0,1 µg) (a 4 °C durante 30 minutos). A continuación, el resultante fue analizado por FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

Ninguno de los anticuerpos anti-hTROP-2 generados se unió a una línea celular de cáncer de hígado humano HuH-7, que no expresaba de manera endógena hTROP-2. Por otro lado, los anticuerpos anti-hTROP-2 se unieron a células HuH-7-hTROP-2, en las que se expresaba de forma estable un gen de hTROP-2 (Figura 2). Posteriormente, se examinó mediante análisis de FACS la reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 generados con líneas celulares de cáncer humano (en las que se expresaba una proteína hTROP-2 de manera endógena en la superficie celular). Como resultado, los 300 tipos generados de anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 se unieron a líneas celulares de cáncer de páncreas humano (PK-59 y BxPC-3). En particular, anticuerpos K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 y T5-86, que presentaban actividad inhibidora del crecimiento tumoral *in vivo,* todos unidos a líneas celulares de cáncer humano a niveles altos. Por ejemplo, en comparación con un caso en el que las líneas celulares de cáncer reaccionaron solo con anti-IgG de ratón marcado con PE (BD Biosciences Pharmingen), los anticuerpos mencionados anteriormente presentaron la siguiente capacidad de unión a células PK-59 y a células BxPC-3 a una intensidad de fluorescencia media: K5-70 (44 veces), T6-16 (59 veces), K5-107 (89 veces), K5-116-2-1 (122 veces) y T5-86 (15 veces) (a células PK-59; Figura 3); y K5-70 (45 veces), T6-16 (25 veces), K5-107 (90 veces), K5-116-2-1 (121 veces) y T5-86 (10 veces) (a células BxPC-3; Figura 4).

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

[Ejemplo 12]

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

Con el fin de examinar la especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 generados, la reactividad de

los anticuerpos con una proteína TROP-2 de ratón que muestra homología del 80 % en el nivel de secuencia de aminoácidos con la proteína hTROP-2 y con una proteína TROP-1/EpCAM humana que muestra homología del 50 % en el nivel de secuencia de aminoácidos con la proteína hTROP-2, se examinó mediante análisis de FACS.

Específicamente, cada uno de un vector de expresión (TROP-2-pcDNA3.1 (+) de ratón, proporcionado por el Instituto de Biociencias Moleculares y Celulares, Universidad de Tokio) que comprende el ADNc de longitud completa de un gen de TROP-2 de ratón (número de referencia de GenBank NM_020047, Y08830) y un vector de expresión (pcDNA3.1-hEpCAM-*myc*/His) que comprende el ADNc de longitud completa de un gen de TROP-1/EpCAM humano (n.º de referencia de GenBank NM_002354), se introdujo de manera transitoria en células CHO-K1, utilizando el reactivo Lipofectamine2000 (Invitrogen). A continuación, de 24 a 48 horas después, las células se retiraron de una placa de cultivo tratándolas con tripsina y después se preparó una suspensión celular. La suspensión celular preparada de este modo se hizo reaccionar sucesivamente con el anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 producido (0,1 µg) y con anti-IgG de ratón marcado con PE y después se analizó mediante FACSCalibur.

Un anticuerpo T2-102 (IgG1 de ratón) usado como control positivo, que mostró reactividad cruzada con TROP-2 de ratón, presentó alta capacidad de unión a las células CHO-K1 en las que el gen de TROP-2 de ratón se expresaba de forma transitoria. Por otro lado, los anticuerpos K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 y T5-86 no mostraron dicha reactividad cruzada con TROP-2 de ratón (Figura 7).

De manera similar, un anticuerpo monoclonal anti-EpCAM humano (BD Biosciences Pharmingen) usado como control positivo presentó alta capacidad de unión a las células CHO-K1 en las que se expresó de manera transitoria EpCAM/TROP-1 humano. Por otro lado, los anticuerpos K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 y T5-86 no mostraron dicha reactividad cruzada con EpCAM/TROP-1 humano (Figura 8).

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

[Ejemplo 13]

[Medición de la actividad inhibidora del crecimiento celular]

Como un método para examinar la actividad del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 para inhibir la función de hTROP-2, se evaluó la influencia del anticuerpo en el crecimiento celular de células cancerosas humanas, que expresan de manera endógena hTROP-2 en la superficie celular, se evaluó midiendo el número de células vivas usando TetraColor ONE (Seikagaku Corporation). Específicamente, se suspendieron células PK-59 en un medio RPMI1640 que contenía suero bovino fetal al 0,5 % (fabricado por Bio West) a una concentración celular de 2 x 10^5 células/ml y después se añadieron 100 µl de la suspensión celular preparada a cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos. Posteriormente, se añadieron a los pocillos IgG de ratón (control negativo) y anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 (concentraciones finales: 0,1 y 1 µg/ml) y las mezclas se cultivaron después a 37 °C en una incubadora de CO_2 al 5 % durante 72 horas. Como control, se usó un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 disponible en el mercado (clon YY01, Santa Cruz). Se añadió TetraColor ONE (Seikagaku Corporation) a los pocillos y después se hicieron reaccionar en una incubadora de CO_2 al 5 % durante 1 a 2 horas. Después de finalizar la reacción, la placa de cultivo de 96 pocillos se sometió directamente a la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm (longitud de onda de control: 655 nm) utilizando un lector de microplacas. El experimento se llevó a cabo usando 3 pocillos para cada grupo. Se llevó a cabo una prueba de diferencias significativas según la prueba de t de Student y se determinó que $P < 0,05$ era estadísticamente significativo.

Entre los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2, que habían sido generados por la propia compañía de los inventores hasta ahora, se examinaron aproximadamente 160 clones mediante el método descrito anteriormente, con respecto a su efecto sobre el crecimiento celular de células PK-59. Como resultado, se confirmó que T6-16, T5-86, K5-70 y K5-107, que habían presentado actividad inhibidora del crecimiento tumoral *in vivo,* tenían una actividad inhibidora del crecimiento celular del 20 % al 40 %, en comparación con IgG de ratón (control negativo). Resultó evidente que estos anticuerpos anti-hTROP-2 tienen actividad para unirse a proteínas hTROP-2, que se expresaron en la superficie de células cancerosas humanas, para neutralizar las proteínas hTROP-2 y para inhibir el crecimiento de las células cancerosas (Figura 9).

[Ejemplo 14]

[Ensayo de raspado]

El efecto de un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 sobre la capacidad migratoria de células cancerosas humanas se evaluó mediante un ensayo de raspado. Se suspendieron células PK-59 en un medio RPMI1640 que contenía suero bovino fetal al 10 % a una concentración celular de 3 x 10^5 células/ml y después se añadieron 100 µl de la suspensión celular preparada a cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos. Cuando las células se hicieron confluyentes, se desprendió una porción de las células cultivadas en monocapa, de modo que la placa se raspara en

una dirección longitudinal con el extremo de una punta. Se añadieron un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 y un IgG de ratón usado como control negativo al medio a concentraciones finales de 0,1 y 1 µg/ml, respectivamente, y después se llevó a cabo cultivo durante 24 horas. Antes de la adición del anticuerpo (Día 0) y 24 horas después del cultivo (Día 1), se fotografió la región con células desprendidas y después se midió la distancia entre las células. Por otra parte, el área de dicha región desprendida se cuantificó usando software Scion Image. El experimento se llevó a cabo usando 8 pocillos para cada grupo. Se llevó a cabo una prueba de diferencias significativas según la prueba de t de Student y se determinó que $P < 0,05$ era estadísticamente significativo.

Se examinó el efecto de un anticuerpo de hTROP-2 sobre la capacidad migratoria de las células que invaden la región de raspado. Como con el ensayo de inhibición del crecimiento celular, se evaluaron anticuerpos que tienen efectos beneficiosos. Como método de evaluación, las células se fotografiaron el día 0 (cuando se añadió el anticuerpo) y el día 1 (24 horas después de la adición del anticuerpo) y la distancia migratoria (µm) y el área de una región de raspado se determinaron mediante análisis de imágenes. Como resultado, como se muestra en la Figura 10, se observaron claras diferencias con respecto a la capacidad migratoria de las células. Los anticuerpos T6-16 y K5-70, que se usaron en la presente prueba, tuvieron una actividad inhibidora significativa del crecimiento celular, en comparación con el control. Incluso en una prueba de reproducibilidad, se observó la misma tendencia. En particular, T6-16 tuvo un resultado de $P < 0,01$ (por la prueba de t de Student) y se encontró correlación con la prueba *in vivo.*

[Ejemplo 15]

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

Modelo de prevención

Se recogieron líneas celulares de cáncer de páncreas (PK-59 y BxPC-3), que expresaron hTROP-2, mediante tratamiento con tripsina, y se les añadió PBS para preparar una suspensión celular que tenía una concentración de 1 x 10^8 células/ml. La suspensión celular preparada de este modo se mezcló con una cantidad igual de Matrigel (BD Biosciences Pharmingen) en hielo. Usando una jeringa de 26 G, se inyectaron 100 µl de la mezcla obtenida (5 x 10^6 células) en la hipodermis del flanco derecho de cada ratón hembra desnudo de 6 semanas de edad (Balb/c, nu/nu). El día del trasplante de las células cancerosas (Día 1), los ratones se dividieron en grupos y se inició la administración del anticuerpo (1,5 o 10 mg/kg de peso corporal, administración intraperitoneal). A continuación, se continuó la administración del anticuerpo a intervalos de una vez cada tres días. La actividad antitumoral se evaluó basándose en la frecuencia de formación de tumores y el volumen tumoral. El volumen tumoral se calculó mediante la siguiente fórmula.

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

Modelo de tratamiento

Se recogieron líneas celulares de cáncer de páncreas (PK-59 y BxPC-3), que expresaron hTROP-2, mediante tratamiento con tripsina, y se les añadió PBS para preparar una suspensión celular que tenía una concentración de 1 x 10^8 células/ml. La suspensión celular preparada de este modo se mezcló con una cantidad igual de Matrigel (BD Biosciences Pharmingen) en hielo. Usando una jeringa de 26 G, se inyectaron 100 µl de la mezcla obtenida (5 x 10^6 células) en la hipodermis del flanco derecho de cada ratón hembra desnudo de 6 semanas de edad (Balb/c, nu/nu). De cinco a seis días después del trasplante de las células cancerosas, los ratones cuyo volumen tumoral había aumentado de 50 a 150 mm^3 (valor medio: aproximadamente 100 mm^3) se dividieron en grupos. El día en que los ratones se dividieron en grupos se definió como un primer día (Día 1) y se inició la administración del anticuerpo. El anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a intervalos de una vez cada tres días (10 mg/kg de peso corporal). La actividad antitumoral se evaluó midiendo el volumen tumoral. Se llevó a cabo una prueba de diferencias significativas según la prueba de t de Student y se determinó que $P < 0,05$ era estadísticamente significativo.

[Ejemplo 16]

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

Es esencial para un anticuerpo utilizado para el tratamiento del cáncer, que se dirige a hTROP-2, tener la actividad de destruir específicamente tejidos tumorales que expresan hTROP-2 o inhibir el crecimiento de tumor en un modelo de xenoinjerto.

Se evaluaron anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 (aproximadamente 160 clones), que se produjeron nuevos en la presente invención, usando los modelos de tratamiento con xenoinjerto de una línea celular de cáncer de páncreas PK-59. Las células PK-59 expresan, en su superficie, EpCAM (Figura 11A) que actúa como un marcador de células madre del cáncer de páncreas (Chenwei Li, *et al*. Cancer Res 2007; 67: (3). 1030-1037) y también expresan glucoproteína P/MDR1 (Figura 11B) y ABCG2/CDw338 (Figura 11C) (Chen, C. J. *et al*. Cell 47 (3), 381-389 (1986), Allikmets, R., *et al*. Hum. Mol. Genet. 5 (10), 1649-1655 (1996)), que son transportadores ABC asociados con

resistencia a fármacos. Además, las células PK-59 contienen una fracción celular (8,93 %) (Figura 11D) positiva tanto para CD24 como para CD44, que es característica de las células madre del cáncer de páncreas y se supone que son una línea celular de cáncer de páncreas humano de alta malignidad (Chenwei Li, *et al*. Cancer Res 2007; 67: (3). 1030-1037, Jane E. Visvader y Geoffrey J. Lindeman. Nat Rev Cancer. Vol. 8(10):755-68, 2008).

La mayoría de los aproximadamente 160 clones de nueva generación no presentaron efectos beneficiosos sobre los modelos de tratamiento con xenoinjerto de células PK-59. Entre dichos clones, se pudieron obtener clones que presentaban actividad inhibidora del crecimiento tumoral significativa, a saber, clones K5-70, T6-16, K5-107, T5-86 y K5-116-2-1.

En un grupo de administración del clon K5-70 (IgG2a de ratón), la tasa de crecimiento tumoral se inhibe de manera estadísticamente significativa. En el 21er día después del inicio de la administración (día 21), el volumen tumoral de un grupo de control (N = 14) fue de 1200,8 ± 377,3 mm^3, mientras que el volumen tumoral del grupo de administración del clon K5-70 fue de 748,7 ± 175,0 mm^3 (P < 0,01 por la prueba de t de Student) (Figura 12A). Cuando el volumen tumoral en el momento del inicio de la administración del anticuerpo se definió como 1.0, el volumen tumoral en el 21er día (Día 21) fue de 7,8 en el grupo de administración del clon K5-70, mientras que el volumen tumoral del grupo de control fue de 12,5 (Figura 12A). El peso del tumor extirpado fue de 0,43 ± 0,14 g (P < 0,01 por la prueba de t de Student) en el grupo de administración del clon K5-70, mientras que el del grupo de control fue de 0,73 ± 0,26 g. Por tanto, el clon K5-70 presentó actividad inhibidora de aproximadamente 60 % (Figura 12B).

De manera similar, la tasa de crecimiento tumoral se inhibió de manera estadísticamente significativa incluso en un grupo de administración del clon K5-107 (IgG1 de ratón) (N = 8), un grupo de administración del clon T6-16 (IgG2a de ratón) (N = 8), un grupo de administración del clon T5-86 (IgG1 de ratón) y un grupo de administración del clon K5-116-2-1 (IgG2a de ratón) (N = 8). En el 17º día después del inicio de la administración (Día 17), los volúmenes tumorales del grupo de administración del clon K5-107 (N = 8) y el grupo de administración del clon T6-16 (N = 8) fueron de 698,2 ± 175,9 mm^3 (P < 0,05 por la prueba de t de Student) y 707,2 ± 254,5 mm^3 (P < 0,05 por la prueba de t de Student), respectivamente, mientras que el volumen tumoral del grupo de control fue de 1039,3 ± 271,6 mm^3. De forma análoga, en el 16º día después del inicio de la administración (Día 16), el volumen tumoral del grupo de administración del clon K5-116-2-1 (N = 8) fue de 508,5 ± 225,2 mm^3 (P < 0,05 por la prueba de t de Student), mientras que el volumen tumoral del grupo de control (N = 8) fue de 797,0 ± 172,9 mm^3 (Figura 13).

Por otro lado, en el caso del clon T5-86, en el 15º día después del inicio de la administración (Día 15), el tumor del grupo de administración del clon T5-86 (N = 8) fue de 744,1 ± 289,1 mm^3, mientras que el volumen tumoral del grupo de control (N = 8) fue de 1033,2 ± 319,4 mm^3. Por tanto, no se encontró ninguna diferencia significativa con respecto al volumen tumoral. Sin embargo, en la comparación del peso tumoral, que se realizó el mismo día, el peso tumoral del grupo de administración del clon T5-86 fue de 0,44 ± 0,13 g (P < 0,05 por la prueba de t de Student), mientras que el peso tumoral del grupo de control fue de 0,62 ± 0,14 g. Por tanto, el clon T5-86 presentó actividad inhibidora significativa.

Por otra parte, con respecto al volumen tumoral y peso tumoral, la relación (T/C) de cada grupo de administración de clon de anticuerpo al grupo de control el último día del experimento se muestra en la Tabla 2 a continuación. Como se muestra en la Tabla 2, cada clon de anticuerpo presentó actividad inhibidora significativa (T/C = 62 % a 72 %) en cada grupo de administración de clones de anticuerpos.

Tabla 2

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

*P < 0,05, **P < 0,01 (por la prueba de t de Student)

Asimismo, se analizó la actividad antitumoral de cada uno de los clones K5-70, T6-16 y K5-116-2-1 en los modelos de prevención con xenoinjerto de la línea celular de cáncer de páncreas PK-59. Después de finalizar la administración de cada clon de anticuerpo, se inhibió el crecimiento tumoral en todos los individuos (N = 8). En el 18º día después del inicio de la administración (Día 18), el volumen tumoral del grupo de administración del clon K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) fue de 62,4 ± 80,4 mm^3 (P < 0,01 por la prueba de t de Student), mientras que el volumen tumoral del grupo de control (N = 8) fue de 880,8 ± 206,4 mm^3. Por tanto, el clon K5-70 presentó actividad inhibidora del crecimiento tumoral del 92,9 %. En el 28º día después del inicio de la administración (Día 28), el volumen tumoral del grupo de administración del clon T6-16 (10 mg/kg de peso corporal) fue de 152,14 ± 122,3 mm^3 (P < 0,01 por la prueba de t de Student), mientras que el volumen tumoral del grupo de control (N = 8) fue de 992,3 ± 250,8 mm^3. Por tanto, el clon T6-16 presentó actividad inhibidora del crecimiento tumoral del 84,6 %. En el 20º día después del inicio de la

administración (Día 20), el volumen tumoral del grupo de administración del clon K5-116-2-1 (10 mg/kg de peso corporal) fue de 207,7 ± 319,2 mm^3 (P < 0,01 por la prueba de t de Student), mientras que el volumen tumoral del grupo de control (N = 8) fue de 1159,4 ± 413,3 mm^3. Por tanto, el clon K5-116-2-1 presentó actividad inhibidora del crecimiento tumoral de 82,1 % (Figura 14 y Tabla 3). Por otra parte, en todos los experimentos, no hubo diferencias significativas entre el grupo de control y cada grupo de administración de anticuerpos anti-hTROP-2 con respecto a un cambio en el peso corporal medio durante el periodo de prueba.

Con respecto al volumen tumoral y peso tumoral, la relación (T/C) de cada grupo de administración de clon de anticuerpo al grupo de control el último día del experimento se muestra en la Tabla 3 a continuación. Como se muestra en la Tabla 3, se observó inhibición significativa del crecimiento tumoral en cada grupo de administración de clones de anticuerpos y, en particular, se confirmó un efecto significativo tal como T/C = 10 % o menos en el grupo de administración del clon K5-70.

Tabla 3

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

**P < 0,01 (por la prueba de t de Student)

El anticuerpo anti-TROP-2 conocido AR47A6.4.2 (patente de los Estados Unidos n.º 7420041) ha presentado el efecto de inhibición del crecimiento tumoral, a una dosificación de 20 mg/kg, en modelos de prevención con xenoinjerto usando diversas líneas celulares de cáncer humano. Este anticuerpo anti-TROP-2 AR47A6.4.2 ha inhibido el crecimiento tumoral de una línea celular de cáncer de páncreas humano PL45 en un porcentaje de casi 100 %. Sin embargo, este anticuerpo ha tenido el efecto de inhibir el tumor en una línea celular de cáncer de páncreas BxPC-3 en un porcentaje de aproximadamente 50 %, en una línea celular de cáncer de próstata PC-3 en un porcentaje de aproximadamente 40 %, en una línea celular de cáncer de mama MCF-7 en un porcentaje de aproximadamente 60 % y en una línea celular de cáncer de colon Colo205 en un porcentaje de aproximadamente 40 %. Por el contrario, el anticuerpo anti-hTROP-2 de la invención de la presente solicitud ha presentado un mayor efecto inhibidor del crecimiento tumoral a una dosificación de la mitad de la dosis mencionada anteriormente (10 mg/kg de peso corporal).

[Ejemplo 17]

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

Como en el caso de uso de los modelos de tratamiento de xenoinjerto descritos anteriormente de la línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59, se analizó la actividad antitumoral del clon K5-70 en modelos de prevención de xenoinjerto y modelos de tratamiento de xenoinjerto de una línea celular de cáncer de páncreas humano BxPC-3.

En comparación con un grupo de control (N = 8), el crecimiento tumoral del grupo de administración del clon K-70 se inhibió de manera significativa. En el 52º día (día 52), el volumen tumoral del grupo de administración del clon K5-70 (N = 8) fue de 236,0 ± 136,4 mm^3, mientras que el volumen tumoral del grupo de control (N = 8) fue de 616,3 ± 266,8 mm^3. Por tanto, el clon K-70 presentó un efecto inhibidor del crecimiento tumoral del 61,7 % (P < 0,01 por la prueba de t de Student) (Figura 15).

A partir de los resultados mencionados anteriormente, resultó evidente que el anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 presenta actividad inhibidora del crecimiento tumoral significativa *in vivo* en al menos dos especies de células cancerosas.

[Ejemplo 18]

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

Con el fin de analizar con más detalle la actividad inhibidora del crecimiento tumoral *in vivo* del anticuerpo anti-hTROP-2, se llevó a cabo una prueba dependiente de la dosis. Como se muestra en la Figura 16, el crecimiento tumoral de las células PK-59 se inhibió de forma dependiente de la dosis mediante la administración del anticuerpo K5-70. En el 21^{er} día después de la administración del anticuerpo (Día 21), el volumen tumoral de un grupo de control (N = 8) fue de 937,8 ± 295,3 mm^3. Por otro lado, el volumen tumoral del grupo de administración del anticuerpo K5-70 (1 mg/kg de peso corporal) (N = 8) fue de 493,5 ± 305,1 mm^3, mostrando una tasa de inhibición del 50 %, y el volumen tumoral del grupo de administración del anticuerpo K5-70 (5 mg/kg de peso corporal) (N = 8) fue de 124,7 ± 89,0 mm^3, mostrando una tasa de inhibición del 90 %. Por tanto, resultó evidente que, en comparación con el anticuerpo anti-TROP-2 conocido AR47A6.4.2 (patente de los Estados Unidos n.º 7420041), el anticuerpo anti-hTROP-2 de la

presente invención presenta *in vivo* un efecto inhibidor del crecimiento tumoral equivalente al del anticuerpo anti-TROP-2 AR47A6.4.2 a una dosificación de un veinteavo del anticuerpo anti-TROP-2 AR47A6.4.2 y que presenta un mayor efecto inhibidor del 90 % a una dosificación de un cuarto del mismo.

[Ejemplo 19]

[Ensayo de epítopo]

Preparación de proteína TROP-2 quimérica humana/de ratón

Se preparó un gen de TROP-2 humano/ratón según un método de PCR. Los cebadores de PCR que se muestran a continuación se diseñaron basándose en una secuencia del gen de TROP-2 humano y una secuencia del gen de TROP-2 de ratón (n.º de referencia de Genbank NM_020047).

Cebadores de TROP-2-C humano/de ratón

Y606 (lado directo): 5'-cctgagcctacgctgcgacgaagtggtgcg-3' (SEQ ID NO: 10)
Y607 (lado inverso): 5'-cgcaccacttcgtcgcagcgtaggctcagg-3' (SEQ ID NO: 11)

Cebadores de TROP-2-A humano/de ratón

Y612 (lado directo): 5'-gactgctccacgctgacttccaagtgcctg-3' (SEQ ID NO: 12)
Y613 (lado inverso): 5'-caggcacttggaagtcagcgtggagcagtc-3' SEQ ID NO: 13)

Cebadores de TROP-2-B humano/de ratón

Y614 (lado directo): 5'-ctcgtggacaacgatggcctctacgacccg-3' (SEQ ID NO: 14)
Y615 (lado inverso): 5'-cgggtcgtagaggccatcgttgtccacgag-3' (SEQ ID NO: 15)

Cebadores de TROP-2-D de ratón/humano

Y608 (lado directo): 5'-ccaaagcctgcgctgcgatgagctggtgcgc-3' (SEQ ID NO: 16)
Y609 (lado inverso): 5'-gcgcaccagctcatcgcagcgcaggctttgg-3' (SEQ ID NO: 17)

Cebadores de TROP-2-E de ratón/humano

Y616 (lado directo): 5'-agcttcctatccgcggtgcactacgagcag-3' (SEQ ID NO: 18)
Y617 (lado inverso): 5'-ctgctcgtagtgcaccgcggataggaagct-3' (SEQ ID NO: 19)

Cebadores de TROP-2-F de ratón/humano

Y618 (lado directo): 5'-gacattaaaggcgagtctctattccagggc-3' (SEQ ID NO: 20)
Y619 (lado inverso): 5'-gccctggaatagagactcgcctttaatgtc-3' (SEQ ID NO: 21)

Cebadores de TROP-2 de ratón

Cebador directo: 5-ctactccaccccaccctggcg-3' (SEQ ID NO: 22)
Cebador inverso: 5'-ctcgagcaagctaggttcgcttctc-3' (SEQ ID NO: 23)

Al cebador inverso de TROP-2 de ratón, se añadió una secuencia digerida con enzimas de restricción *XhoI*, excepto por un codón de parada. En la Figura 17 se muestra una vista esquemática de las proteínas TROP-2 quiméricas humanas/de ratón preparadas.

La proteína quimérica hmTROP-2-A es una proteína quimérica, que consiste en un polipéptido que va desde el extremo N al aminoácido en la posición 69 de la proteína hTROP-2 y un polipéptido que va desde el aminoácido en la posición 64 hasta el extremo C de la proteína TROP-2 de ratón. La proteína quimérica hmTROP-2-B es una proteína quimérica, que consiste en un polipéptido que va desde el extremo N al aminoácido en la posición 101 de la proteína hTROP-2 y un polipéptido que va desde el aminoácido en la posición 96 hasta el extremo C de la proteína TROP-2 de ratón. La proteína quimérica hmTROP-2-C es una proteína quimérica, que consiste en un polipéptido que va desde el extremo N al aminoácido en la posición 145 de la proteína hTROP-2 y un polipéptido que va desde el aminoácido en la posición 140 hasta el extremo C de la proteína TROP-2 de ratón. La proteína quimérica mhTROP-2-D es una proteína quimérica, que consiste en un polipéptido que va desde el extremo N al aminoácido en la posición 139 de la proteína TROP-2 de ratón y un polipéptido que va desde el aminoácido en la posición 146 hasta el extremo C de la proteína hTROP-2. La proteína quimérica mhTROP-2-E es una proteína quimérica, que consiste en un polipéptido que va desde el extremo N al aminoácido en la posición 187 de la proteína TROP-2 de ratón y un polipéptido que va desde el aminoácido en la posición 194 hasta el extremo C de la proteína hTROP-2. La proteína quimérica mhTROP-2-F es

una proteína quimérica, que consiste en un polipéptido que va desde el extremo N al aminoácido en la posición 227 de la proteína TROP-2 de ratón y un polipéptido que va desde el aminoácido en la posición 234 hasta el extremo C de la proteína hTROP-2.

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

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

Los vectores de expresión descritos anteriormente pcDNA3.1-hTROP-2-*myc*/His, pcDNA3.1-hmTROP-2-C-*myc*/His y pcDNA3.1-mhTROP-2-D-*myc*/His se introdujeron cada uno en células HEK293. Se llevó a cabo selección usando un antibiótico G418 (Calbiochem) y se establecieron líneas celulares HEK293 que expresaban de manera constitutiva la proteína hTROP-2, la proteína quimérica hmTROP-2-C y la proteína quimérica mhTROP-2-D.

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

Para analizar las regiones de unión más detalladamente, se prepararon vectores usados en la expresión de proteínas quiméricas hmTROP-2-A, hmTROP-2-B, mhTROP-2-E y mhTROP-2-F y se analizó la reactividad de las proteínas quiméricas con los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 que presentaban efectos beneficiosos (Figura 19). Los vectores de expresión recién preparados, que debían usarse en la expresión de las proteínas quiméricas, se introdujeron cada uno en las células HEK293 y después se llevó a cabo análisis de FACS, usando las células que expresaban de manera transitoria las proteínas quiméricas. Los anticuerpos K5-70, K5-107, T5-86 y K5-116-2-1 reaccionaron con hmTROP-2-A, pero no reaccionaron con mhTROP-2-B. Los 6 tipos de anticuerpos monoclonales examinados reaccionaron con hTROP-2. Estos resultados mostraron claramente que la región de unión de los anticuerpos K5-70, K5-107, T5-86 y K5-116-2-1 está presente en una región que va desde el extremo N al aminoácido en la posición 69 de hTROP-2. Por otra parte, los anticuerpos T6-4 y T6-16 no reaccionaron ni con mhTROP-2-E ni con mhTROP-2-F. Esto sugirió que estos anticuerpos reconocen una región que va desde el aminoácido en la posición 146 hasta el aminoácido en la posición 193 de hTROP-2.

[Ejemplo 20]

[Inmunohistoquímica]

<Materiales/método>

Las siguientes matrices de tejidos normales y cancerosos se usaron en inmunohistotinción.

Matrices de tejido humano normal:

Órganos humanos, normales por duplicado (n.º de catálogo: AB1, Super Bio Chips)
Tejidos normales más que puntos únicos (n.° de catálogo: A103(VI), ISU ABXIS) Matrices de tejido de cáncer de pulmón:

Cáncer de pulmón humano-metástasis-normal (n.º de catálogo: CCA3, Super Bio Chips)
Tejido de carcinoma de pulmón humano con tejido de borde, 2 núcleos de localización (n.º de catálogo: OD-CT-RsLug03-002, Shanghai Outdo Biotech)

Matriz de tejido de cáncer de páncreas:

Tejido de carcinoma de páncreas humano con tipo monopatológico de 60 casos, 2 núcleos de localización (n.º de catálogo: OD-CT-DgPan03-001, Shanghai Outdo Biotech)

Matrices de tejido de cáncer de hígado:

Carcinoma hepatocelular, grados I a III con controles de tejido normal, matrices de tejidos de 63 casos (n.º de catálogo: CS03-01-002U, Cybrdi)
Tejido de carcinoma de hígado humano con tipo monopatológico de 30 casos, 2 núcleos de localización (n.º de catálogo: OD-CT-DgLiv02-002, Shanghai Outdo Biotech) Matrices de tejido de cáncer colorrectal:

Cáncer colorrectal humano (n.º de catálogo: CD3, Super Bio Chips)
Carcinoma de colon humano con tejido de borde, 2 núcleos de localización (n.º de catálogo: OD-CT-DgCol03-002, Shanghai Outdo Biotech)

Matrices de tejido de metástasis en ganglio linfático y metástasis hepática de cáncer colorrectal:

Cáncer colorrectal (colon y recto) con matriz de tejido de metástasis en ganglio linfático coincidente, 44 casos/99 núcleos, portaobjetos de prueba (n.º de catálogo: CO991t, Biomax us)
Cáncer colorrectal (colon y recto) con matriz de tejido de metástasis en ganglio linfático coincidente y adyacente normal, 43 casos/99 núcleos (N.º de catálogo: CO992, Biomax us)
Tejidos de cáncer de colon_metástasis hepática (N.º de catálogo: A203(IV), ISU ABXIS) Matrices de tejido de cáncer de mama:

Cáncer de mama humano-metástasis-normal (N.º de catálogo: CBA3, Super Bio Chips)
Carcinoma de mama humano con tejido de borde, 2 núcleos de localización (n.º de catálogo: OD-CT-RpBre03-002, Shanghai Outdo Biotech)

Matrices de tejido de cáncer de estómago:

Cáncer de estómago humano (n.º de catálogo: CQ1, Super Bio Chips)
Carcinoma gástrico humano con tejido de borde, 2 núcleos de localización (n.º de catálogo: OD-CT-DgStm03-002, Shanghai Outdo Biotech)

Matriz de tejido de cáncer de esófago:

Cáncer de esófago humano (n.º de catálogo: CR1, Super Bio Chips)
Carcinoma de esófago humano con tejido de borde, 2 núcleos de localización (n.º de catálogo: OD-CT-DgEso03-002, Shanghai Outdo Biotech)

Matriz de tejido de cáncer de ovario:

Cáncer de ovario humano (n.º de catálogo: CJ1, Super Bio Chips)

Matriz de tejido de cáncer de próstata:

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

Matriz de tejido de cáncer de vejiga:

Carcinoma de vejiga/carcinoma de células de transición, grados I a III con matrices de tejido normal (n.º de catálogo: CC12-01-001U, Cybrdi)

La información del paciente y la información clínica con respecto a las matrices de tejido descritas anteriormente se obtuvieron de hojas de datos adjuntas a este documento y de las páginas de inicio de compañías individuales.

Método de inmunohistotinción

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

Más específicamente, estas operaciones se llevaron a cabo de la siguiente manera. Una sección incluida en parafina se sometió a un tratamiento de desparafinación y después se sometió a un tratamiento de proteasa con pepsina (DAKO) a 37 °C durante 5 minutos. Después de la activación del antígeno, la sección se trató a temperatura ambiente durante 20 minutos usando una solución preparada añadiendo una solución de peróxido de hidrógeno a metanol hasta una concentración final de 0,3 %, de modo que se eliminó la actividad peroxidasa endógena. El resultante se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos dos veces y después se bloqueó a temperatura ambiente durante 30 minutos usando una solución de PBS que contenía suero de caballo normal al 1,5 % (DAKO), para llevar a cabo una operación para bloquear la unión inespecífica en los tejidos. Posteriormente, el resultante se hizo reaccionar con el clon de anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 K5-63-17 (concentración final: 10 µg/ml), que se había diluido con una solución de PBS que contenía suero de caballo normal al 1,5 %, a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos tres veces. A continuación, un anticuerpo biotinilado anti-IgG de ratón (Vector), que se había diluido 200 veces con una solución de PBS que contenía suero de caballo normal al 1,5 %, se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. El producto de reacción se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos tres veces y se mezcló un reactivo del kit Vectastain ABC (Vector) de acuerdo con el manual de instrucciones incluido con el mismo, para preparar un complejo ABC. Este complejo ABC se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. El producto de reacción se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos tres veces y después se llevó a cabo desarrollo del color usando solución de tinción sencilla de sustrato de peroxidasa DAB Histofine (Nichirei Biosciences). Después de finalizar el desarrollo del color, el producto de reacción se lavó con agua desionizada durante 5 minutos y el núcleo se tiñó con solución de hematoxilina de Mayer (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). A continuación, se llevó a cabo deshidratación con alcohol, seguido de penetración con xileno y montaje en Entellan New (Merck Japón).

<Resultados>

Expresión de hTROP-2 en tejidos humanos normales

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

Expresión de hTROP-2 en tejidos cancerosos humanos

Para examinar la expresión de hTROP-2 (tasa hTROP-2 positiva) en tejidos cancerosos humanos, las matrices de tejido canceroso de diversas especies de cáncer humano se inmunotiñeron usando el clon de anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 K5-63-17. Una sección tisular, en la que se tiñeron 10 % o más de las células cancerosas, se definió como hTROP-2 positiva. Los resultados de tinción se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Tejidos cancerosos	número de casos TROP-2 positivos/número total de casos	Tasa TROP-2 positiva (%)
Cáncer de mama	**32/80**	**40**
Cáncer de pulmón	**53/81**	**65,4**
Cáncer de esófago	**69/90**	**76,7**
Cáncer de estómago	**25/90**	**27,8**
Cáncer de colon	**29/178**	**16,3**

(continuación)

Tejidos cancerosos	número de casos TROP-2 positivos/número total de casos	Tasa TROP-2 positiva (%)
Cáncer de páncreas	**26/62**	**41,9**
Cáncer de hígado	**7/92**	**7,61**
Cáncer de vejiga	**42/59**	**71,2**
Cáncer de próstata	**35/38**	**92,1**
Cáncer de ovario	**14/58**	**24,1**

Se muestran imágenes teñidas representativas en la Figura 21. Entre las especies de cáncer, con respecto a las cuales se ha analizado la expresión de hTROP-2, el cáncer de próstata tuvo la mayor tasa positiva (92,1 %) y, además, cáncer de pulmón (65,4 %), cáncer de esófago (76,7 %), cáncer de vejiga (71,2 %) y similares tuvieron tasas positivas altas. El cáncer de hígado tuvo la tasa positiva más baja (7,61 %). Se observó a partir de imágenes teñidas que, como en las células normales, hTROP-2 estaba muy localizado en la membrana celular incluso en el caso de las células cancerosas (Figura 21 A a F, H e I). Además, hTROP-2 también estaba localizado en el citoplasma en algunos casos (Figura 21A, B, E y G).

La tasa hTROP-2 positiva en el cáncer de páncreas fue del 41,9 %. Se analizó la relación entre esta tasa hTROP-2 positiva y el grado (grado de diferenciación) del cáncer de páncreas. Como resultado, hTROP-2 se expresó con alta frecuencia en cáncer de páncreas con un alto grado, en concreto, con un grado bajo de diferenciación (Tabla 5).

Tabla 5

Manchas hTROP-2 positivas de cáncer de páncreas 26/62 (41,94 %)

Grado	-	+	Tasa positiva	
I	**8**	**0**	**0 %**	
I - II	**5**	**0**	**0 %**	
II	**19**	**21**	**52,5 %**	
II - III	**4**	**5**	**55,6 %**	**p<0,01**
total	**36**	**26**		

[Ejemplo 21]

[Actividad antitumoral del anticuerpo K5-70 mediante administración única en modelos de prevención con xenoinjerto de la línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59]

Se presentó fuerte actividad antitumoral *in vivo* de un clon K5-70 (IgG2a de ratón) incluso mediante una única administración de K5-70 a una dosificación de 10 mg/kg de peso corporal a modelos de prevención con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de páncreas humano PK -59. En un grupo de control (IgG de ratón, 10 mg/kg de peso corporal, N = 3), se observó la formación de tumores en todos los individuos y el volumen tumoral en el 28º día después del trasplante celular (día 28) fue de 781,7 ± 74,5 mm^3. Por otro lado, en un grupo en el que el anticuerpo K5-70 se administró solo una vez el día del trasplante de las células cancerosas (Día 1) (10 mg/kg de peso corporal, N = 3), el volumen tumoral el día 28 fue 144,4 ± 176,9 mm^3 (P < 0,05 por la prueba de t de Student), mostrando actividad inhibidora del crecimiento tumoral del 81,5 % (Figura 22A). Con respecto al peso tumoral, el peso tumoral del grupo de control el día 28 fue de 0,59 ± 0,06 g. Por el contrario, el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo del clon K5-70 fue de 0,07 ± 0,10 g (P < 0,01 por la prueba de t de Student), mostrando una actividad inhibidora del 88 % (Figura 22B). Con respecto al volumen tumoral y al peso tumoral, se inhibió por completo la formación de tumores en 2 de cada 3 individuos en el grupo de administración del anticuerpo K5-70 a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal por administración (Figura 22C).

[Ejemplo 22]

[Actividad antitumoral del anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 en modelos de tratamiento con xenoinjerto de la línea celular de cáncer de colon humano SW480]

La actividad antitumoral de cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 (clones K5-70, K5-116-2-1 y T6-16) se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de colon humano SW480. Se trasplantaron células SW480 (5 x 10^6 células) por vía subcutánea en el flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-SCID hembra de 6 semanas de edad (Día 1). Cuando el volumen tumoral medio alcanzó 100 mm^3, se llevó a cabo agrupación (día 7 o día 10). Desde el día 7 o el día 10, se llevó a cabo administración intraperitoneal del anticuerpo a intervalos de administración de una vez cada tres días. La actividad antitumoral del anticuerpo del clon K5-70 y las actividades antitumorales del anticuerpo del clon K5-116-2-1 y el anticuerpo del clon T6-16 fueron evaluadas por estudios independientes, por separado. En el estudio de evaluación de la actividad antitumoral del anticuerpo K5-70, el volumen tumoral de un grupo de control (IgG de ratón (10 mg/kg de peso corporal), N = 8) en el 44º día después del trasplante de células cancerosas (Día 44) fue de 365,4 ± 214,6 mm^3. Por otro lado, el volumen

tumoral de un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) fue de 27,4 ± 29,4 mm^3 (P < 0,01 mediante la prueba de t de Student) y, por tanto, se inhibió significativamente la formación de tumores en el grupo de administración de K5-70 (tasa inhibidora: 92,5 %) (Figura 23A). Con respecto al peso tumoral, el peso tumoral del grupo de control fue de 0,11 ± 0,07 g, mientras que el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo K5-70 fue de 0,005 ± 0,007 (g) (P < 0,01 por la prueba de t de Student), mostrando una tasa inhibidora de 95,5 % (Figura 23B). En particular, en dos de los ocho ratones individuales en el grupo de administración del anticuerpo K5-70, la formación de tumores se inhibió por completo y no se pudo confirmar la presencia de tumores.

En el estudio de evaluación de las actividades antitumorales del anticuerpo K5-116-2-1 y el anticuerpo T6-16, que se llevó a cabo por separado, el volumen tumoral del grupo de control el día 42 fue de 713,8 ± 354,5 mm^3 (N = 8). Por el contrario, el volumen tumoral del grupo de administración del anticuerpo K5-116-2-1 (10 mg/kg de peso corporal) fue de 188,9 ± 97,4 mm^3 (N = 8, P < 0,01 por la prueba de t de Student) (Figura 24A) y el volumen tumoral del grupo de administración del anticuerpo T6-16 (10 mg/kg de peso corporal) fue de 292,8 ± 199,7 mm^3 (N = 8, P < 0,05 por la prueba de t de Student) (Figura 25A). Por tanto, los dos grupos de administración anteriores mostraron tasas inhibidoras de 73,5 % y 59,0 %, respectivamente. También con respecto al peso tumoral, el peso tumoral del grupo de control fue de 0,39 ± 0,19 g. Por el contrario, el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo K5-116-2-1 fue de 0,10 ± 0,07 g (P < 0,01 por la prueba de t de Student) y el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo T6-16 fue de 0,17 ± 0,14 g (P < 0,05 por la prueba de t de Student). Por tanto, los dos grupos de administración anteriores mostraron tasas inhibidoras de 72,2 % y 56,4 %, respectivamente (Figura 24B y Figura 25B).

[Ejemplo 23]

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

Posteriormente, la actividad antitumoral dependiente de la dosis del anticuerpo K5-70 se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de colon humano SW480. Se trasplantaron células SW480 (5 x 10^6 células) por vía subcutánea en el flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid hembra de 6 semanas de edad. Diez días después del trasplante (Día 10) en el que el volumen tumoral medio alcanzó 100 mm^3, los ratones se dividieron en un grupo de control (IgG de ratón, grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal, N = 8, 104,4 ± 17,6 mm^3), un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (1 mg/kg de peso corporal) (N = 8, 104,3 ± 16,1 mm^3), un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (5 mg/kg de peso corporal) (N = 8, 104,6 ± 15,9 mm^3) y un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal) (N = 8, 104,8 ± 14,9 mm^3). Después, se llevó a cabo administración intraperitoneal a intervalos de administración de una vez cada tres días. El día 42, el volumen tumoral del grupo de control fue de 713,8 ± 354,5 mm^3. Por otro lado, en los grupos de administración del anticuerpo K5-70, se observó actividad inhibidora de la formación de tumores dependiente de dosis. Es decir, el volumen tumoral del grupo de administración de 1 mg/kg de peso corporal fue de 485,0 ± 207,3 mm^3 (tasa inhibidora: 32,1 %), el volumen tumoral del grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal fue de 339,5 ± 253,2 mm^3 (tasa inhibidora: 52,4 %) y el volumen tumoral del grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal fue de 355,4 ± 202,8 mm^3 (tasa inhibidora: 50,2 %, P < 0,05 por la prueba de t de Student) (Figura 26A). De forma análoga, con respecto al peso tumoral el día 42, el peso tumoral del grupo de control fue de 0,39 ± 0,19 g. Por otro lado, el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo K5-70 (1 mg/kg de peso corporal) fue de 0,24 ± 0,11 g (tasa inhibidora: 37,8 %), el peso tumoral del grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal fue de 0,17 ± 0,14 g (tasa inhibidora: 55,8 %, P < 0,05 por la prueba de t de Student) y el peso tumoral del grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal fue de 0,20 ± 0,13 g (tasa inhibidora: 47,1 %). Por tanto, se confirmó la actividad antitumoral dependiente de dosis (Figura 26B).

[Ejemplo 24]

[Análisis de intervalos de administración del anticuerpo K5-70 para los modelos de tratamiento con xenoinjerto usando la línea celular de cáncer de colon humano SW480]

Posteriormente, para analizar los intervalos de administración óptimos del anticuerpo K5-70, la actividad antitumoral del clon K5-70 cuando se administró una vez a la semana (una vez cada 7 días) se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de colon humano SW480. Se trasplantaron células SW480 (5 x 10^6 células) por vía subcutánea en el flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid hembra de 6 semanas de edad. Diez días después del trasplante (Día 10) en el que el volumen tumoral medio alcanzó 100 mm^3, los ratones se dividieron en un grupo de control (IgG de ratón, 10 mg/kg de peso corporal, N = 8, 104,42 ± 15,1 mm^3) y un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal, N = 8, 104,3 ± 16,1 mm^3). Después, se llevó a cabo administración intraperitoneal una vez cada 7 días. El día 42, el volumen tumoral del grupo de control fue de 713,8 ± 354,5 mm^3, mientras que el volumen tumoral del grupo de administración del anticuerpo K5-70 (administrado una vez a la semana) fue de 332,3 ± 239,9 mm^3 (tasa inhibidora: 55 %, P < 0,05 por la prueba de t de Student) (Figura 27A). Por otra parte, cuando el intervalo de administración se aumentó a una vez cada 10 días y a una vez cada dos semanas, el volumen tumoral del grupo de control el día 39 fue de 956,9 ± 367,8 mm^3. Por otro lado, el volumen tumoral del grupo de administración del anticuerpo K5-70 (administrado una vez cada 10 días) el día 39 fue de 525,4 ± 180,6 mm^3 (tasa inhibidora: 45,1 %, P < 0,01 por la prueba de t de Student) y el volumen tumoral del

grupo de administración del anticuerpo K5-70 (administrado una vez cada 2 semanas) fue de 459,4 ± 217,6 mm^3 (tasa inhibidora: 52,0 %, P < 0,01 por la prueba de t de Student) (Figura 27B). En las técnicas anteriores (documentos US 7420040 y US 7420041), cuando se administraron anticuerpos a modelos de tratamiento con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de páncreas (BxPC-3) a una dosis de 20 mg/kg de peso corporal, tres veces a la semana (a intervalos de administración de 2 días), los anticuerpos presentaron actividad antitumoral a una tasa inhibidora de 50 % a 60 %. Por el contrario, el anticuerpo K5-70 presentó actividad antitumoral equivalente a las de las técnicas anteriores, a una dosis de la mitad de las técnicas anteriores (10 mg/kg de peso corporal), una vez cada 2 semanas (a intervalos de administración de 13 días). En consecuencia, resultó evidente que el anticuerpo K5-70 presentaba actividad antitumoral significativa en una dosis total de al menos un doceavo de las de las técnicas anteriores.

[Ejemplo de referencia 1]

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

Posteriormente, la actividad antitumoral dependiente de la dosis del anticuerpo T6-16 se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de colon humano SW480. Se trasplantaron células SW480 (5 x 10^6 células) por vía subcutánea en el flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid hembra de 6 semanas de edad. Diez días después del trasplante (Día 10) en el que el volumen tumoral medio alcanzó 100 mm^3, los ratones se dividieron en un grupo de control (IgG de ratón, 10 mg/kg de peso corporal, N = 8, 105,8 ± 9,9 mm^3), un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (1 mg/kg de peso corporal, N = 8, 104,4 ± 13,3 mm^3), un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (5 mg/kg de peso corporal, N = 8, 104,7 ± 13,0 mm^3) y un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (10 mg/kg de peso corporal, N = 8, 104,8 ± 12,4 mm^3). Después, se llevó a cabo administración intraperitoneal a intervalos de administración de una vez cada tres días. El día 43, el volumen tumoral del grupo de control fue de 473,5 ± 137,0 mm^3. Por otro lado, en los grupos de administración del anticuerpo T6-16, se observó actividad inhibidora de la formación de tumores dependiente de dosis. Es decir, el volumen tumoral del grupo de administración de 1 mg/kg de peso corporal fue de 397,9 ± 97,5 mm^3 (tasa inhibidora: 16,0 %), el volumen tumoral del grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal fue de 195,9 ± 89,7 mm^3 (tasa inhibidora: 58,7 %, P < 0,01 por la prueba de t de Student) y el peso tumoral del grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal fue de 190,2 ± 56,5 mm^3 (tasa inhibidora: 59,8 %, P < 0,01 por la prueba de t de Student) (Figura 28A). De forma análoga, con respecto al peso tumoral el día 43, el peso tumoral del grupo de control fue de 0,19 ± 0,07 g. Por otro lado, el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo T6-16 (1 mg/kg de peso corporal) fue de 0,20 ± 0,08 g, el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo T6-16 (5 mg/kg de peso corporal) fue de 0,08 ± 0,04 g (tasa inhibidora: 57,9 %, P < 0,01 por la prueba de t de Student) y el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo T6-16 (10 mg/kg de peso corporal) fue de 0,09 ± 0,04 g (tasa inhibidora: 52,6 %, P < 0,01 por la prueba de t de Student). Por tanto, se confirmó la actividad antitumoral dependiente de dosis (Figura 28B).

[Ejemplo de referencia 2]

[Análisis de intervalos de administración del anticuerpo T6-16 para los modelos de tratamiento con xenoinjerto usando la línea celular de cáncer de colon humano SW480]

Posteriormente, para analizar los intervalos de administración óptimos del anticuerpo T6-16, La actividad antitumoral del clon T6-16 cuando se administró a intervalos de administración una vez a la semana (una vez cada 7 días) y una vez cada 10 días se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de colon humano SW480. Se trasplantaron células SW480 (5 x 10^6 células) por vía subcutánea en el flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid hembra de 6 semanas de edad. Diez días después del trasplante (Día 10) en el que el volumen tumoral medio alcanzó 100 mm^3, los ratones se dividieron en un grupo de control (IgG de ratón, 10 mg/kg de peso corporal, N = 8, 105,8 ± 9,9 mm^3), un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (una vez a la semana) (10 mg/kg de peso corporal, N = 8, 105,0 ± 11,6 mm^3) y un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (una vez cada 10 días) (10 mg/kg de peso corporal, N = 5, 130,8 ± 2,4 mm^3). Después, se inició la administración. El día 43, el volumen tumoral del grupo de control fue de 473,5 ± 137,0 mm^3. Por otro lado, el volumen tumoral del grupo de administración del anticuerpo T6-16 (una vez a la semana) fue de 243,7 ± 65,3 mm^3 (tasa inhibidora: 48,5 %, P < 0,01 por la prueba de t de Student) y el volumen tumoral del grupo de administración del anticuerpo T6-16 (una vez cada 10 días) fue de 297,8 ± 54,4 mm^3 (tasa inhibidora: 37,1 %, P < 0,05 por la prueba de t de Student) (Figura 29). En las técnicas anteriores (documentos US 7420040 y US 7420041), cuando se administraron anticuerpos a modelos de tratamiento con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de páncreas (BxPC-3) a una dosis de 20 mg/kg de peso corporal, tres veces a la semana (a intervalos de administración de 2 días), los anticuerpos presentaron actividad antitumoral a una tasa inhibidora de 50 % a 60 %. Por el contrario, el anticuerpo T6-16 presentó actividad antitumoral significativa, cuando se administró a una dosis de la mitad de las técnicas anteriores y a una frecuencia de una vez cada 10 días (a intervalos de administración de 9 días). En consecuencia, resultó evidente que el anticuerpo T6-16 presentaba actividad antitumoral significativa en una dosis total de al menos un octavo de las de las técnicas anteriores.

[Ejemplo 25]

[Análisis de la actividad antitumoral del clon K5-70 en modelos de prevención con xenoinjerto usando la línea celular

de cáncer de próstata humano DU-145]

La actividad antitumoral del clon K5-70 en el cáncer de próstata humano se evaluó con modelos de prevención con xenoinjerto usando células DU-145 (banco celular RIKEN, RCB2143). Se trasplantaron por vía subcutánea células DU-145 (5 x 10^6 células) en cada uno de ratones desnudos hembra de 6 semanas de edad (Balb/c, nu/nu). El día en que se llevó a cabo el trasplante se definió como el Día 1. Los ratones se dividieron en un grupo de control (IgG de ratón) (N = 8) y un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (N = 8). Desde el día 1, el anticuerpo K-70 y el anticuerpo de control se administraron por vía intraperitoneal a los ratones a una frecuencia de una vez cada 3 días a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal. El día 40, el volumen tumoral del grupo de control fue de 368,2 ± 307,8 mm^3. Por otro lado, el volumen tumoral del grupo de administración del anticuerpo K5-70 fue de 30,6 ± 29,6 mm^3 ($P < 0,05$ por la prueba de t de Student), mostrando una actividad inhibidora de la formación de tumores de aproximadamente 90 % (Figura 30A). Con respecto al peso tumoral, se observó actividad antitumoral adicional significativa. El peso tumoral del grupo de control el día 40 fue de 0,18 ± 0,18 g. Por el contrario, en el grupo de administración del anticuerpo K5-70, los tumores desaparecieron de los 8 ratones individuales y, por tanto, se inhibió por completo la formación de tumores (Figura 30B). A partir de los resultados mencionados anteriormente, resultó evidente que el clon de anticuerpo monoclonal anti-TROP-2 humano K5-70 muestra fuerte actividad antitumoral incluso en células de cáncer de próstata humano.

[Ejemplo 26]

[Actividad inhibidora de metástasis del anticuerpo K5-70 en modelos de metástasis hepática usando la línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59]

La metástasis del cáncer es un factor importante que influye en el pronóstico clínico en el tratamiento del cáncer gastrointestinal. El control de la metástasis es significativamente importante desde el punto de vista terapéutico. Si se pudiera suprimir no solo la formación de tumores, sino también la metástasis del cáncer a otros órganos mediante la administración de un anticuerpo para su uso en terapia contra el cáncer que se dirija a TROP-2, se esperaría una alta utilidad clínica. Por tanto, esta es una propiedad deseada como anticuerpo terapéutico contra el cáncer.

La expresión de TROP-2 se confirmó en muchos tipos de carcinomas. Se señaló que TROP-2 se expresaba a un nivel alto particularmente en focos metastásicos (Br. J. Cancer (2008); 99: 1290-1295, Clin. Cancer Res. (2006); 12: 3057-3063, Mod. Pathol. (2008); 21: 186-191). Por otra parte, también se señaló que, cuando se trasplantaron células cancerosas con el gen de Trop-2 introducido en ratones desnudos mediante administración transesplénica o transpancreática, la incidencia de metástasis hepáticas aumentó (documento WO 2010/089782, Molecular Cancer (2010); 9: 253) y, por tanto, el informe sugirió la importancia de TROP-2 en el proceso de metástasis del cáncer. Sin embargo, hasta la fecha, no ha habido ningún informe que describa específicamente que un anticuerpo que se dirige a TROP-2 tenga acción inhibidora de la metástasis *in vivo.*

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-hTROP-2 K5-70, que fue descubierto por la presente invención, presenta altos efectos terapéuticos en modelos de xenoinjerto, en cuya hipodermis se habían trasplantado células de cáncer de páncreas humano. Se demostró mediante un ensayo de raspado realizado *in vitro* que el anticuerpo K5-70 puede suprimir la capacidad de migración de una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59, además del efecto de suprimir el crecimiento de células cancerosas. Por tanto, se consideró que el anticuerpo K5-70 podría inhibir la metástasis del cáncer *in vivo.* Por lo tanto, se examinó el efecto inhibidor de la metástasis de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-hTROP-2, usando modelos en los que las células PK-59 se inyectaron en el bazo de ratones desnudos para desarrollar metástasis hepática.

El día anterior al trasplante de células cancerosas, los ratones se dividieron en grupos. Después, se administró un anticuerpo monoclonal anti-hTROP-2 (K5-70) o un anticuerpo de control (IgG de ratón purificado) por vía intraperitoneal a los ratones a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal. Al día siguiente, se recogió una línea celular de cáncer de páncreas humano (PK-59) que expresaba hTROP-2 de forma endógena mediante tratamiento con tripsina y después se preparó una suspensión celular de 2 x 10^7 células/ml con PBS. La suspensión celular se conservó en hielo hasta el trasplante. Cada ratón hembra desnudo de 6 o 7 semanas de edad (Balb/c, nu/nu) se anestesió mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital y se extirparon de 10 a 15 mm del flanco izquierdo del mismo con anestesia. Se extrajo el bazo de la cavidad abdominal y después se inyectaron 50 µl de la suspensión celular (1 x 10^6 células) en el bazo usando una jeringa 27G. Cuatro minutos después de la inyección de las células, el hilio del bazo se ligó con suturas de seda 5-0 y después se extirpó el bazo. El peritoneo cortado se cerró con suturas de seda 4-0 y el sitio quirúrgico se cerró después con grapas para heridas (AUTOCLIP 9 mm, Becton Dickinson). Además, siete días después del trasplante de células cancerosas, el anticuerpo K-70 y el anticuerpo de control se administraron a los ratones a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal. De cuatro a seis semanas después del trasplante de células cancerosas, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Después, se extirpó el hígado de cada ratón y se confirmó la presencia o ausencia de focos metastásicos.

En el grupo de control en el que se administró el IgG de ratón a los ratones, en 4 de los 6 ratones en los que se habían trasplantado células PK-59, se observaron focos metastásicos evidentes (de 2 a 7 focos) alrededor del lóbulo hepático de cuatro a seis semanas después del trasplante (Figura 31A, incidencia de metástasis: 67 %, Tabla 6). Por el

contrario, en cuatro ratones en el grupo de administración del anticuerpo K5-70, en el que también se habían trasplantado las células PK-59, dichos focos metastásicos no se observaron en el hígado de todos los ratones y, por tanto, una incidencia de metástasis fue del 0 % (Figura 31B, Tabla 6).

Tabla 6

Efecto supresor de la metástasis del clon K5-70 en modelos de metástasis hepática producidos por trasplante transesplénico de células PK-59 en ratones desnudos

Grupo de administración	Semanas después del trasplante	N.º de individuo	Número de focos metastásicos	Determinación de metástasis
Grupo de control	4S	C-1	0	-
	4S	C-2	5	++
	6S	C-3	7	++
	6S	C-4	7	++
	6S	C-5	2	+
	6S	C-6	0	-
		Número promedio de focos metastásicos	3,5	Incidencia de metástasis 67 %
Grupo de administración de K5-70	4S	K-1	0	-
	6S	K-2	0	-
	6S	K-3	0	-
	6S	K-4	0	-
		Número promedio de focos metastásicos	0	Incidencia de metástasis 0 %

A partir de estos resultados, resultó evidente que el anticuerpo anti-hTROP-2 K5-70 tiene acción inhibidora extremadamente fuerte sobre la metástasis hepática de la línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59.

[Ejemplo 27]

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

En los últimos años, se han desarrollado muchos fármacos quimioterapéuticos para suprimir el crecimiento de células cancerosas como fármacos terapéuticos contra el cáncer. Estos fármacos han logrado determinados resultados de tratamiento. Sin embargo, estos fármacos quimioterapéuticos han sido problemáticos con respecto a efectos secundarios asociados con la acción supresora del crecimiento de los mismos en células normales distintas de células cancerosas y la reaparición del cáncer después de la suspensión del tratamiento. En consecuencia, si la reaparición tumoral después de la finalización del tratamiento con fármacos quimioterapéuticos pudiera suprimirse mediante la administración de un anticuerpo terapéutico contra el cáncer dirigido a TROP-2, se esperaría una alta utilidad clínica. Por tanto, esta es una propiedad deseada como anticuerpo terapéutico contra el cáncer.

Como agentes terapéuticos para el cáncer colorrectal, además de 5-FU y fármacos que contienen platino, se ha aplicado recientemente clorhidrato de irinotecán (topotecina, Daiichi Sankyo Co., Ltd.) que tiene un efecto inhibidor de topoisomerasa a sitios clínicos. También con respecto a modelos animales, se ha señalado el efecto antitumoral de clorhidrato de irinotecán en modelos de ratón, en los que se habían trasplantado diversos tipos de células tumorales humanas, incluyendo cáncer de colon como un ejemplo típico (Cancer Chemother Pharmacol. (1991); 28(3):192-8). Por tanto, el efecto preventivo de reaparición del clon de anticuerpo anti-hTROP-2 K5-70 (IgG2a de ratón) sobre el tumor recidivante después de la administración de clorhidrato de irinotecán se ha examinado con modelos de xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de colon humano SW480. Se trasplantaron por vía subcutánea células SW480 (5×10^6 células) en el flanco derecho de ratones NOD-scid hembra de 8 semanas de edad. Once días después del trasplante (Día 11) en el que el volumen tumoral medio alcanzó 100 mm^3, los ratones se dividieron en un grupo sin tratamiento (grupo de administración de solución salina normal, N = 8, 130,7 ± 16,2 mm^3) y un grupo de administración de clorhidrato de irinotecán (CPT-11, topotecina, Daiichi Sankyo Co., Ltd.) (N = 16, 123,0 ± 21,4 mm^3). A continuación, se administró por vía intraperitoneal clorhidrato de irinotecán a los ratones a una dosis de 40 mg/kg de peso corporal, una vez cada 3 días, 3 veces totales (días 11, 14 y 17). Al tercer día después de la administración final de clorhidrato de irinotecán (Día 20), el volumen tumoral del grupo sin tratamiento alcanzó 232,1 ± 21,1 mm^3. Por otro lado, el volumen tumoral del grupo de administración de clorhidrato de irinotecán fue de 126,6 ± 26,6 mm^3 ($P < 0,01$ por la prueba de t de Student) y, por tanto, se observó un efecto supresor de tumores evidente. En esta fase, el grupo de administración de clorhidrato de irinotecán se dividió en dos grupos basándose en el tamaño tumoral. Un grupo se

definió como un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal, N = 8, volumen tumoral el día 20: 126,0 ± 28,0 mm^3) y el otro grupo se definió como un grupo de administración de IgG de ratón (10 mg/kg de peso corporal, N = 8, volumen tumoral el día 20: 127,2 ± 27,0 mm^3). La administración intraperitoneal de los anticuerpos y la medición de un volumen tumoral se llevaron a cabo en cada grupo una vez cada 3 días, para evaluar la reaparición de un tumor (Figura 32). En el grupo de administración de IgG de ratón, desde el 18º día después de la última administración de clorhidrato de irinotecan (Día 35), se observaron varios ratones que tenían un tumor recidivante evidente con un volumen tumoral mayor de 300 mm^3. En el 30º día después de la última administración de clorhidrato de irinotecán (Día 47), se observó un tumor con un volumen tumoral mayor de 300 mm^3 en 5 de los 8 ratones (volumen tumoral medio: 401,7 ± 172,7 mm^3). Por el contrario, en el grupo de administración del anticuerpo K5-70, la reaparición tumoral se suprimió significativamente y el volumen tumoral medio fue de 180,5 ± 142,1 mm^3 ($P < 0,05$ por la prueba de t de Student) (Figura 32). En particular, en el grupo de administración del anticuerpo K5-70, el volumen tumoral el día 47 se hizo más pequeño que el volumen tumoral cuando los ratones se dividieron en grupos (126,0 ± 28,0 mm^3). El volumen tumoral se convirtió en menos de 100 mm^3 en 4 de los 8 ratones. A partir de estos resultados, resultó evidente que el anticuerpo anti-hTROP-2 K5-70 tiene acción supresora extremadamente fuerte incluso en tumor recidivante después de la administración de clorhidrato de irinotecán.

[Ejemplo 28]

[Mapeo de epítopos usando tecnología CLIPS]

<Materiales y métodos>

Síntesis de péptidos

Se obtuvieron 15meros y 30meros de péptidos lineales procedentes de dominios extracelulares de TROP-2, que se usaron en el presente experimento, por síntesis en fase sólida según un método de Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo). Además, para análisis de epítopos discontinuo, se sintetizó un péptido de 17 unidades derivado de un dominio extracelular de TROP-2, a ambos extremos del cual se habían agregado restos de cisteína, y se reconstruyó una conformación que tenía una o dos estructuras de bucle mediante tecnología CLIPS (tecnología de péptidos ligados químicamente en armazones). Cuando otro resto de cisteína estaba presente cerca del resto de cisteína añadido, se sustituyó con alanina.

ELISA de exploración de epítopos

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

<Resultados>

Los anticuerpos monoclonales anti-hTROP-2 K5-70, K5-107, K5-116-2-1, T5-86 y T6-16, que presentaron efectos beneficiosos, fueron sometidos a análisis de epítopos usando la tecnología CLIPS (péptidos químicamente unidos en armazones). Debe observarse que la expresión "número de aminoácidos" se usa en los presentes ejemplos para indicar el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 (proteína hTROP-2 (323 restos de aminoácidos)).

El resultado del análisis para el anticuerpo K5-70 se muestra en la Tabla 7 a continuación. Como resultado, se descubrió que 33 péptidos presentan fuerte actividad de unión al anticuerpo K5-70. En estos 33 péptidos, una secuencia que comprende VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD (números de aminoácidos 43-65) (péptidos n.º 1-7 y 9 mostrados en la Tabla 7), una secuencia que comprende HHILIDLRHRPTAG (números de aminoácidos 152-165) (péptidos n.º 14, 22-24 y 28 mostrados en la Tabla 7), una secuencia que comprende VHYEQPTIQIELRQ (números de aminoácidos 193-206) (péptidos n.º 8, 10, 12, 13, 18, 20, 21, 23, 26, 28, 30 y 32 mostrados en la Tabla 7) y una secuencia que comprende DLDAELRRLFRER (números de aminoácidos 171-183) (péptidos n.º 11, 16, 18, 19, 21, 22, 29 y 31 mostrados en la Tabla 7) aparecieron repetidamente. El anticuerpo K5-70 se unió de manera particularmente fuerte a la secuencia que comprendía VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD. A partir de estos resultados, se sugirió que, en la proteína hTROP-2, es probable que los 4 tipos de regiones de secuencias peptídicas mencionadas anteriormente sean epítopos del anticuerpo K5-70.

Tabla 7

Unión del anticuerpo K5-70 a péptidos CLIPS procedentes de dominios extracelulares de TROP-2 humano

número	péptido	unión de K5-70
1	NKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCST	2742
2	TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTS	2604
3	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	2562
4	MTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT	2402
5	KMNCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTL	1770
6	PTNNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDC	1391
7	VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK	932
8	CAAVHYEQPTIQIELRCAAVHYEQPTIQIELRC	876
9	CPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD	839
10	CVHYEQPTIQIELRQNCVHYEQPTIQIELRQNC	825
11	HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC	725
12	RLFRERYRLHPKFVAAVHYEQPTIQIELRQ	687
13	AVHYEQPTIQIELRQ	642
14	CAGAFNHSDLDAELRRCHHILIDLRHRPTAGAC	624
15	CPKFVAAVHYEQPTIQCGLDLRVRGEPLQVERC	579
16	CHSDLDAELRRLFRERCGLDLRV	538
17	FQGRGGLDLRVRGEP	538
18	CVHYEQPTIQIELRQNCDLDAELRRLFRERYRC	524
19	CHSDLDAELRRLFRERCRGEPLQ	519
20	CTIQIELRQNTSQKAACVHYEQPTIQIELRQNC	513
21	CVHYEQPTIQIELRQNCHSDLDAELRRLFRERC	511
22	CHHILIDLRHRPTAGACHSDLDAELRRLFRERC	489
23	CHHILIDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	489
24	CHHILIDLRHRPTAGACGLDLRVRGEPLQVERC	488
25	CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC	483
26	CVHYEQPTIQIELRQNC	483
27	CAFNHSDLDAELRRLFCVHYEQPTIQIELRQNC	478
28	CVHYEQPTIQIELRQNCHHILIDLRHRPTAGAC	473
29	CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC	472
30	VHYEQPTIQIELRQNCGLDLRVRGEPLQVERC	470
31	CDELVRTHHILIDLRHCDLDAELRRLFRERC	469
32	AVHYEQPTIQIELRQCAVHYEQPTIQIELRQC	468
33	CHSDLDAELRRLFRERCDELVRTHHILIDLRHC	466

El resultado del análisis para el anticuerpo K5-107 se muestra en la Tabla 8 a continuación. Como resultado, se descubrió que una secuencia que comprendía VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD (números de aminoácidos 43-65) estaba comprendida en 10 de los 20 péptidos (péptidos n.º 1-6, 8, 9, 14 y 17 mostrados en la Tabla 8) (Tabla 8).

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

Tabla 8

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

número	péptido	unión de K5-107
1	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	2763
2	NKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCST	2761
3	KMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTL	2752
4	MTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT	2726
5	CPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD	2723
6	TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTS	2720
7	TCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAV	2716
8	VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK	2689
9	CSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKC	2655
10	CTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMA	2655
11	NCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGM	2207
12	DNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSG	1816
13	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	1525
14	CTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDASTLTSKC	1118
15	QDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGS	874
16	SPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKCL	561
17	CTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDASTC	380
18	TVCSPDGPGGRCQCR	312
19	CAPKNARTLVRPSEHACARTLVRPSEHALVDNC	284
20	HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC	272

El resultado del análisis para el anticuerpo K5-116-2-1 se muestra en la Tabla 9 a continuación. En este análisis, tres tipos de secuencias peptídicas, en concreto, una secuencia que comprende VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD (números de aminoácidos 43-65) (péptidos n.º 1-7, 15 y 25 mostrados en la Tabla 9), una secuencia que comprende HHILIDLRHRPTAG (números de aminoácidos 152-165) (péptidos n.º 8-11, 16, 17, 19, 20, 22-24 y 27-29 mostrados en la Tabla 9) y una secuencia que comprende DLDAELRRLFRER (números de aminoácidos 171-183) (péptidos n.º 11-14, 17, 19, 21, 23 y 29 mostrados en la Tabla 9) aparecieron varias veces (Tabla 9). En consecuencia, se sugirió que, en la proteína hTROP-2, estos tres tipos de regiones de secuencia peptídica pueden ser epítopos del anticuerpo K5-116-2-1.

Tabla 9

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

número	péptido	unión de K5-116-2-1
1	TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTS	2672
2	NKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCST	2613
3	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	2482
4	MTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT	2440
5	KMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTL	2423
6	CPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD	2136
7	PTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDC	1723
8	CAGAFNHSDLDAELRRCHHILIDLRHRPTAGAC	1643
9	CTHHILIDLRHRPTAGC	1586
10	CVHYEQPTIQIELRQNCHHILIDLRHRPTAGAC	1504
11	CHHILIDLRHRPTAGCHSDLDAELRRLFRERC	1475
12	HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC	1467
13	CDAELRRLFRERYRLHCHSDLDAELRRLFRERC	1462
14	CDAELRRLFRERYRLHCPK	1442
15	VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK	1432
16	DLSLRCDELVRTHHILIDLRHRPTAGAFNH	1421
17	CDELVRTHHILIDLRHCDLDAELRRLFRERYRC	1392
18	CFQGRGGLDLRVRGEPC	1376
19	CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC	1366
20	CGLDLRVRGEPLQVERCHHILIDLRHRPTAGAC	1342
21	CHSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC	1331
22	CDELVRTHHILIDLRHCHHILIDLRHRPTAGAC	1323
23	CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC	1266
24	CHHILIDLRHRPTAGACRGEPLQVERTLIYYLC	1229
25	CSPDGPGGRCQCRAL	1227
26	CTVASPDGPGGRAQARACVHYEQPTIQIELRQNC	1223
27	CHHILIDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	1222
28	LSLRCDELVRTHHILIDLRHRPTAGAFNHS	1220
29	CDELVRTHHILIDLRHCHSDLDAELRRLFRERC	1205

ES 2 927 090 T3

Los resultados del análisis para los anticuerpos T5-86 y T6-16 se muestran en la Tabla 10 y la Tabla 11 a continuación, respectivamente. En estos análisis, los anticuerpos se unen fuertemente a un péptido que comprende una secuencia que consiste en DPEGRFKARQCN (números de aminoácidos 109-120). La secuencia peptídica mencionada anteriormente estaba comprendida en 22 de los 26 péptidos que se unían al anticuerpo T5-86 (péptidos n.º 1-4, 6-8, 10-13, 15-19 y 21-26 mostrados en la Tabla 10) y estaba comprendida en 4 de los 26 péptidos que se unen al anticuerpo T6-16 (péptidos n.º 1, 2, 9 y 13 mostrados en la Tabla 11) (Tabla 10 y Tabla 11). Por otra parte, en el análisis con respecto al anticuerpo T5-86, aparte de la secuencia que comprende DPEGRFKARQCN (números de aminoácidos 109-120), una secuencia que comprende VCSPDGPGGRCQCRA (números de aminoácidos 43-57) (péptidos n.º 5, 14 y 20 mostrados en la Tabla 10) apareció varias veces. Asimismo, también en el análisis con respecto al anticuerpo T6-16, otra secuencia que comprende HHILIDLRHRPTAG (números de aminoácidos 152-165) (péptidos n.º 4-8, 10-12, 19, 21, 23, 25 y 26 mostrados en la Tabla 11) se encontró varias veces. En consecuencia, se sugirió que, en la proteína hTROP-2, dos tipos de regiones de secuencias peptídicas, en concreto, DPEGRFKARQCN (números de aminoácidos 109-120) y VCSPDGPGGRCQCRA (números de aminoácidos 43-57), pueden ser epítopos del anticuerpo K5-86. También se sugirió que, en la proteína hTROP-2, dos tipos de regiones de secuencias peptídicas, en concreto, DPEGRFKARQCN (números de aminoácidos 109-120) y HHILIDLRHRPTAG (números de aminoácidos 152-165), pueden ser epítopos del anticuerpo T6-16.

Tabla 10

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

número	péptido	unión de T5-86
1	CYDPDADPEGRFKARQCADPEGRFKARQANQTC	2306
2	PDCDPEGRFKARQCN	2292
3	CADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC	2287
4	VCSPDGPGGRCQCRA	2263
5	CYDPDADPEGRFKARQCPDADPEGRFKARQANC	2260
6	CADPEGRFKARQANQTCTDPDADPEGRFKARQC	2240
7	CADPEGRFKARQANQTCYDPDADPEGRFKARQC	2208
8	DCDPEGRFKARQCNQ	2150
9	CTVASPDGPGGRAQARCHSDLDAELRRLFRERC	2086
10	CDADPEGRFKARQANQCDADPEGRFKARQANQC	2035
11	DGRFKARQANQTSVAWCARTLVRPSEHALVDNC	2019
12	DADPEGRFKARQANQTCPDADPEGRFKARQANC	1980
13	CPDADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC	1950
14	CSPDGPGGRCQCRAL	1946
15	CEGRFKARQANQTSVACEGRFKARQANQTSVAC	1895
16	CTVASPDGPGGRAQARCPDADPEGRFKARQANC	1890
17	CGLYDPDADPEGRFKACPDADPEGRFKARQANC	1857
18	DPDCDPEGRFKARQCNCQTSVCWCVNSVGVR	1850
19	CPEGRFKARCTANQTSVCDELVRHHILIDLRHC	1841
20	CPDGPGGRAQARALGSCHSDLDAELRRLFRERC	1830
21	CTLVRPSEHALVDNDGCGRFKARQANQTSVAWC	1820
22	CPDADPEGRFKARQANCYDPDADPEGRFKARQC	1795
23	CGLYDPDADPEGRFKACPEGRFKARQANQTSVC	1793
24	YDPDCDPEGRFKARQ	1775
25	CPDADPEGRFKARQANCADPEGRFKARQANQTC	1773
26	CDPEGRFKARQCNQT	1772

Tabla 11

Unión del anticuerpo T6-16 a péptidos CLIPS procedentes de dominios extracelulares de TROP-2 humano

número	péptido	unión de T6-16
1	CVNSVGVRRTDKGDLSCPDCYDPDADPEGRFKARQC	1072
2	CSVGVRRTDKGDLSLRCYDPDADPEGRFKARQC	786
3	HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC	714
4	CDELVRTHHILIDLRHCDLDAELRRLFRERYRC	713
5	CVNSVGVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILI	688
6	VRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILIDLRHRP	670
7	CVERTLIYYLDEIPPKCHHILIDLRHRPTAGAC	626
8	CHHILIDLRHRPTAGACHSDLDAELRRLFRERC	620
9	CVNSVGVRRTDKGDLSCPDADPEGRFKARQANC	611
10	CVHYEQPTIQIELRQNCHHILIDLRHRPTAGAC	602
11	VGVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILIDLRH	601
12	CAGAFNHSDLDAELRRCHHILIDLRHRPTAGAC	592
13	CSVGVRRTDKGDLSLRCPDADPEGRFKARQANC	585
14	CVRPSEHALVDNDGLYCSVGVRRTDKGDLSLRC	573
15	CDAELRRLFRERYRLHCHSDLDAELRRLFRERC	566
16	CSVGVRRTDKGDLSLRCNDGLYDPDADPEGRFC	559
17	CVNSVGVRRTDKGDLSCGLYDPDADPEGRFKAC	553
18	CDLDAELRRLFRERYRCHSDLDAELRRLFRERC	534
19	CDELVRTHHILIDLRHCHHILIDLRHRPTAGAC	534
20	CAGAFN HSDLDAELRRCDLDAELRRLFRERY RC	529
21	CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC	527
22	CVHYEQPTIQIELRQNCDLDAELRRLFRERYRC	526
23	CHHILIDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	524
24	CGVRRTDKGDLSLRADCGVRRTDKGDLSLRADC	524
25	CGLDLRVRGEPLQVERCHHILIDLRHRPTAGAC	521
26	CDLDAELRRLFRERYRCDELVRTHHILIDLRHC	516

[Ejemplo 29]

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

Se extrajo ARN total de 3 x 10^6 hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-TROP-2 de ratón, usando el reactivo TRIzol (Invitrogen). Con respecto al clon K5-70, clon K5-107 y clon K5-116-2-1, se sintetizó ADNc empleando el kit de amplificación de ADNc SMARTer™ RACE (Clontech) según el método incluido con el kit, usando un cebador específico de cadena H de IgG de ratón (5'-TCCAKAGTTCCA-3' (SEQ ID NO: 24)) y un cebador específico de cadena L de IgG de ratón (5'-GCTGTCCTGATC-3' (SEQ ID NO: 25)). Con respecto al clon T6-16, se sintetizó ADNc empleando el kit GeneRacer (Invitrogen) según el método incluido con el kit, usando un cebador oligo dT. Se clonaron cada uno de los genes que codificaban las regiones variables (VH, VL) de las cadenas H y L del clon K5-70 (IgG2a de ratón), el clon K5-107 (IgG1 de ratón) y el clon K5-116-2-1 (IgG2a de ratón) mediante un método de PCR usando el ADNc sintetizado anteriormente como molde. En esta operación, se usó mezcla universal de cebadores A (UPM) 10 × incluida con el kit de amplificación de ADNc SMARTer™ RACE como cebador 5'. Por otro lado, como cebador 3' para la amplificación de VH, se usó un cebador que tenía una secuencia específica para la cadena H de IgG de ratón y como cebador 3' para la amplificación de VL, se usó un cebador que tenía una secuencia específica para la cadena L de IgG de ratón.

Cebador 5' (mezcla universal de cebadores A (UPM) 10 ×):
Largo (0,4 µM)
5’-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3’ (SEQ ID NO: 26)
Corto (2 µM)
5’-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3’ (SEQ ID NO: 27)
Cebador 3' (cebador R):

VH: 5’-GGGAARTARCCCTTGACCAGGCA-3’ (SEQ ID NO: 28)
5’-GGGAARTAGCCTTTGACAAGGCA-3’ (SEQ ID NO: 29)
VL: 5’-CACTGCCATCAATVCTCCACTTGACA-3’ (SEQ ID NO: 30)

Usando cada uno de los cebadores descritos anteriormente, se llevó a cabo PCR con la siguiente composición de solución de reacción y en condiciones de reacción. Además, se preparó un cebador R para amplificación de ADNc de VH mezclando las dos secuencias anteriores entre sí en una relación equimolar y después se usó.

<Composición de solución de reacción>

ADNc molde:	2,5 µl
tampón PrimeSTAR 5 × (Mg^{2+} plus):	10 µl
dNTP 2,5 mM:	4 µl
ADN polimerasa PrimeSTAR HS (2,5 U/µl):	0,5 µl
Mezcla universal de cebadores A (UPM) 10 ×:	5 µl
Cebador R (10 µM):	1 µl
Agua esterilizada:	27 ul
Total:	50 µl

<Condiciones de reacción>

Se llevó a cabo una reacción a 94 °C (10 s) y, a continuación, se realizó un ciclo que consistía en "desnaturalización/disociación por calor a 98 °C (10 s) → hibridación a 60 °C (5 s) → síntesis/elongación a 72 °C (60 s)" 30 veces en total. Por último, se llevó a cabo una reacción a 72 °C (3 min).

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

Se clonaron genes que codificaban las regiones variables (VH, VL) de las cadenas H y L del clon T6-16 mediante un método de PCR usando el ADNc sintetizado anteriormente como molde. En esta operación, se utilizó un cebador incluido con el kit GeneRacer como cebador 5'. Por otro lado, como cebador 3' para la amplificación de VH, se usó un cebador que tenía una secuencia específica para la cadena H de IgG de ratón y como cebador 3' para la amplificación

de VL, se usó un cebador que tenía una secuencia específica para la cadena L de IgG de ratón.

Cebador 5' (cebador F):
5’-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3’ (SEQ ID NO: 31)

Cebador 3' (cebador R):

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

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

Usando cada uno de los cebadores descritos anteriormente, se llevó a cabo PCR con la siguiente composición de solución de reacción y en condiciones de reacción.

<Composición de solución de reacción>

ADNc molde:	1,0 µl
tampón PrimeSTAR 5 × (Mg^{2+} plus):	10 µl
dNTP 2,5 mM:	4 µl
ADN polimerasa PrimeSTAR HS (2,5 U/µl):	0,5 µl
Cebador F (10 µM):	3 µl
Cebador R (10 µM):	1,0 µl
Agua esterilizada:	30,5 µl
Total:	50 µl

<Condiciones de reacción>

Se realizó un ciclo que consistía en "desnaturalización/disociación por calor a 98 °C (10 s) → hibridación a 57 °C (10 s) → síntesis/elongación a 72 °C (60 s)" 35 veces en total.

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

[Ejemplo 30]

[Diseño del anticuerpo humanizado K5-70]

Se llevó a cabo humanización de las regiones variables (VH, VL) del anticuerpo K5-70 preparado en los Ejemplos anteriores de la siguiente manera según el método de Queen *et al*. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033, 1989). En primer lugar, el modelado molecular de la estructura tridimensional de cada región variable del anticuerpo K5-70 se llevó a cabo usando un ordenador. Posteriormente, se realizó búsqueda de homología con las secuencias de región variable de genes de anticuerpos humanos. Como resultado, se seleccionó una secuencia de ADNc (DA980102 VH) con el número de referencia de GenBank de DA980102 como un aceptor que proporciona una región marco conservada (FR) necesaria para humanización del K5-70 VH (Genome Res. 16: 55-65, 2006). De forma análoga, se seleccionó una secuencia de ADNc (L41174 VL) con el número de referencia de GenBank de L41174 como un aceptor que proporciona una región marco conservada (FR) necesaria para humanización del K5-70 VL (J. Biol. Chem. 270:12457-12465, 1995).

Para humanización del K5-70 VH, la secuencia de CDR del K5-70 VH se sustituyó con la posición correspondiente del DA980102 VH usado como aceptor. Como resultado del análisis de la estructura tridimensional según el modelado por ordenador, con respecto a los restos de aminoácidos (isoleucina (I) en la posición 48, lisina (K) en la posición 66, alanina (A) en la posición 67, valina (V) en la posición 71 y treonina (T) en la posición 93) que están adyacentes a la CDR del K5-70 VH y se supone que desempeñan funciones importantes para el mantenimiento de la estructura, se conservaron los del K5-70 VH y la región FR residual se sustituyó con la secuencia aceptora. Los números de posición de restos de aminoácidos en VH y VL se usaron de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al*. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, quinta edición, Publicación del NIH N.º 91-3242, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991).

Por otra parte, era muy probable que la metionina (M) como un resto de aminoácido en la posición 82 de la secuencia aceptora DA980102 VH fuera un resto de aminoácido especial provocado por hipermutación somática. Por tanto, para reducir la antigenicidad potencial, la metionina mencionada anteriormente se sustituyó con leucina (L) que es más

habitual como un resto de aminoácido en la posición 82. Una alineación de las secuencias de aminoácidos del K5-70 VH humanizado (HuK5-70 VH), K5-70 VH y DA980102 VH diseñados de este modo se muestra en la Figura 41.

También con respecto al diseño de K5-70 VL humanizado, se llevó a cabo el mismo trasplante de una secuencia de CDR como se ha descrito anteriormente. Como un resto de aminoácido (lisina (K) en la posición 49) importante para el mantenimiento de la estructura de CDR, se conservó la del K5-70 VL y la región FR residual se sustituyó con la secuencia aceptora (HuK5-70 VL). Se muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos del HuK5-70 VL, K5-70 VL y L41174 VL en la Figura 42.

[Ejemplo de referencia 3]

[Diseño del anticuerpo humanizado T6-16]

Se llevó a cabo humanización de las regiones variables (VH, VL) del anticuerpo T6-16 preparado en los Ejemplos anteriores de la siguiente manera según el método de Queen *et al*. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033, 1989). En primer lugar, el modelado molecular de la estructura tridimensional de cada región variable del anticuerpo T6-16 se llevó a cabo usando un ordenador. Posteriormente, se realizó búsqueda de homología con las secuencias de región variable de genes de anticuerpos humanos. Como resultado, se seleccionó una secuencia de ADNc (DA935238 VH) con el número de referencia de GenBank de DA935238 como un aceptor que proporciona una región marco conservada (FR) necesaria para humanización del T6-16 VH (Genome Res. 16: 55-65, 2006). De forma análoga, se seleccionó una secuencia de ADNc (M99608 VL) con el número de referencia de GenBank de M99608 como un aceptor que proporciona una región marco conservada (FR) necesaria para humanización del T6-16 VL (J. Immunol. 149:2518-2529, 1992).

Para humanización del T6-16 VH, la secuencia de CDR del T6-16 VH se sustituyó con la posición correspondiente del DA935238 VH usado como aceptor. Como resultado del análisis de la estructura tridimensional según el modelado por ordenador, con respecto a los restos de aminoácidos (isoleucina (I) en la posición 48, alanina (A) en la posición 67 y lisina (K) en la posición 73) que están adyacentes a la CDR del T6-16 VH y se supone que desempeñan funciones importantes para el mantenimiento de la estructura, se conservaron las del T6-16 VH y la región FR residual se sustituyó con la secuencia aceptora (HuT6-16 VH1). Además, era poco probable que el resto de lisina (K) en la posición 73 tuviera influencia sobre la formación apropiada de un sitio de unión a antígeno y, por tanto, se diseñó una secuencia de aminoácidos, en la que el resto de lisina del HuT6-16 VH1 fue sustituido con treonina (T) como un resto de aminoácido más generoso, por separado (HuT6-16 VH2). Una alineación de las secuencias de aminoácidos del T6-16 VH humanizado (HuT6-16 VH1 y HuT6-16 VH2), T6-16 VH y DA35238 VH diseñados de este modo se muestra en la Figura 43.

También con respecto al diseño de T6-16 VL humanizado, se llevó a cabo el mismo trasplante de una secuencia de CDR como se ha descrito anteriormente. Los restos de aminoácidos importantes para el mantenimiento de la estructura de CDR se conservaron también en la secuencia aceptora y, como secuencia de FR, se usó la misma secuencia que la secuencia aceptora (HuT6-16 VL). Se muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos del HuT6-16 VL, T6-16 VL y L41174 VL en la Figura 44.

[Ejemplo 31]

[Síntesis de genes humanizados K5-70 VH y VL]

Se prepararon genes que codificaban HuK5-70 VH y HuK5-70 VL de la siguiente manera. El gen se sintetizó basándose en una secuencia de aminoácidos en la que se había añadido una secuencia de péptido señal procedente de K5-70 VH o VL al lado N-terminal de cada uno de los HuK5-70 VH y VL (Operón) diseñados anteriormente. En esta operación sintética de genes, se añadió una secuencia de Kozak (ACC ACC) al lado 5'-terminal de la secuencia génica de cada uno de los HuK5-70 VH y HuK5-70 VL sintetizados. Además, se añadió un sitio EcoRI (GAA TTC) como un sitio de enzima de restricción al extremo 5' del HuK5-70 VH y se añadió un sitio NheI (GCT AGC) al extremo 3' del mismo. De forma análoga, se añadió un sitio AgeI (ACC GGT) como sitio de enzima de restricción al extremo 5' del HuK5-70 VL y se añadió un sitio BsiWI (CGT ACG) al extremo 3' del mismo. El gen HuK5-70 VH y el gen HuK5-70 VL sintetizados se incorporaron en un vector pCR2.1 (Invitrogen) según la clonación de TA. Las secuencias de genes de los HuK5-70 VH y VL preparados por la síntesis génica se muestran en las Figuras 45 y 46, respectivamente.

[Ejemplo de referencia 4]

[Síntesis de genes de T6-16 VH1, T6-16 VH2 y T6-16 VL humanizados]

Se prepararon genes que codificaban HuT6-16 VH1, HuT6-16 VH2 y HuT6-16 VL de la siguiente manera. El gen fue sintetizado, basándose en una secuencia de aminoácidos en la que se había añadido una secuencia peptídica señal procedente de T6-16 VH al lado N-terminal de cada uno de los HuT6-16 VH1 y HuT6-16 VH2 diseñados anteriormente y una secuencia de aminoácidos en la que se había añadido una secuencia peptídica señal procedente de VL T6-16 al lado N-terminal del HuT6-16 VL (Operón). En esta operación sintética de genes, se añadió una secuencia de Kozak

(ACC ACC) al lado 5'-terminal de la secuencia génica de cada uno de los HuT6-16 VH1, HuT6-16 VH2 y HuT6-16 VL sintetizados. Además, se añadió un sitio EcoRI (GAA TTC) como un sitio de enzima de restricción al extremo 5' del HuT6-16 VH1 y HuT6-16 VH2 y se añadió un sitio NheI (GCT AGC) al extremo 3' del mismo. De forma análoga, se añadió un sitio AgeI (ACC GGT) como sitio de enzima de restricción al extremo 5' del T6-16VL humanizado y se añadió un sitio BsiWI (CGT ACG) al extremo 3' del mismo. El gen de HuT6-16 VH1, gen de HuT6-16 VH2 y gen de HuT6-16 VL sintetizados se incorporaron en un vector pCR2.1 (Invitrogen) según la clonación de TA.

Las secuencias de genes de los HuT6-16 VH1, HuT6-16 VH2 y HuT6-16 VL preparados por la síntesis génica se muestran en las Figuras 47 a 49, respectivamente.

[Ejemplo 32]

[Construcción de vectores de expresión génica para genes de K5-70 VH y VL humanizados]

Los genes de HuK5-70 VH y VL, que se habían incorporado al vector pCR2.1 (Invitrogen), fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y NheI, y AgeI y BsiWI, respectivamente, y después se recuperaron fragmentos de genes. Posteriormente, el gen de HuK5-70 VH escindido se insertó en el sitio de EcoRI/NheI de un vector pFUSE-CHIg-hG1 (InvivoGen) como un vector de expresión de células animales para la expresión de una forma de IgG1 humana (pFUSE-CHIg-HuK5-70), mientras que el gen de HuK5-70 VL se insertó en el sitio AgeI/BsiWI de un vector pFUSE2-CLIg-hk (InvivoGen) como un vector de expresión de forma de Igκ humano (pFUSE2-CLIg-HuK5-70). Por tanto, se completó cada construcción.

[Ejemplo de referencia 5]

[Construcción de vectores de expresión génica para genes de T6-16 VH1, T6-16 VH2 y T6-16 VL humanizados]

Los genes de T6-16 VH1 y T6-16 VH2, que se habían incorporado al vector pCR2.1 (Invitrogen), fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y NheI y el gen de T6-16 VL fue digerido con las enzimas de restricción AgeI y BsiWI. Después, se recuperaron fragmentos de genes. Posteriormente, el gen de T6-16 VH1 escindido se insertó en el sitio EcoRI/NheI de un vector pFUSE-CHIg-hG1 (InvivoGen) (pFUSE-CHIg-HuT6-16-1) y el gen de T6-16 VH2 también se insertó en el sitio EcoRI/NheI de un vector pFUSE-CHIg-hG1 (pFUSE-CHIg-HuT6-16-2). El gen de T6-16 VL se insertó en el sitio AgeI/BsiWI de un vector pFUSE2-CLIg-hk (InvivoGen) (pFUSE2-CLIg-HuT6-16). Por tanto, se completó cada construcción.

[Ejemplo 33]

[Establecimiento de la línea celular 293F capaz de expresar de manera estable el anticuerpo HuK5-70, anticuerpo HuT6-16-1 y anticuerpo HuT6-16-2]

Las células 293F (Invitrogen) se mantuvieron y se cultivaron en medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen). Los genes se introdujeron en las células 293F usando un reactivo de fectina 293 (Invitrogen) de acuerdo con protocolos incluidos con el mismo. Es decir, se introdujeron tanto pFUSE-CHIg-HuK5-70 como pFUSE2-CLIg-HuK5-70 en las células 293F y después se llevó a cabo selección de fármacos usando Zeocina (InvivoGen) y Blasticidina (InvivoGen), para establecer una línea celular capaz de expresar de manera estable un anticuerpo HuK5-70. Además, se introdujeron tanto pFUSE-CHIg-HuT6-16-1 como pFUSE2-CLIg-HuT6-16 en las células 293F y después se llevó a cabo la selección de fármacos mencionada anteriormente, para establecer una línea celular capaz de expresar de manera estable un anticuerpo HuT6-16-1. Además, se introdujeron tanto pFUSE-CHIg-HuT6-16-2 como pFUSE2-CLIg-HuT6-16 en las células 293F y después se llevó a cabo la selección de fármacos mencionada anteriormente, para establecer una línea celular capaz de expresar de manera estable un anticuerpo HuT6-16-2.

[Ejemplo 34]

[Purificación de anticuerpo HuK5-70, anticuerpo HuT6-16-1 y proteínas de anticuerpo HuT6-16-2]

Las líneas celulares establecidas que expresan anticuerpos se inocularon cada una en medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen) a una densidad celular de 1 a 2,5 x 10^5 células/ml y, a continuación, se llevó a cabo cultivo en frasco giratorio durante 6 a 8 días. A continuación, se recuperó un sobrenadante de cultivo y cada anticuerpo humanizado se purificó después usando rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) según un método ordinario.

La Figura 50 muestra los resultados obtenidos al confirmar mediante transferencia Western la expresión de cada proteína de anticuerpo humanizado en un sobrenadante de cultivo de las células 293F, en el que se expresaron un anticuerpo HuK5-70, un anticuerpo HuT6-16-1 y un anticuerpo HuT6-16-2. Específicamente, después de finalizar SDS-PAGE, cada proteína se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore, IPVH00010). La membrana se bloqueó a temperatura ambiente durante 30 minutos usando TBS (solución salina tamponada con Tris) que contenía leche desnatada al 5 %. El resultante se lavó con TBST al 0,1 % (TBS que contenía Tween 20 al 0,1 %) durante 5 minutos tres veces y después se dejó reaccionar con un anticuerpo primario.

El carril 1 indica un sobrenadante de cultivo de células 293F en las que no se habían introducido genes (control negativo) y el carril 2 indica un sobrenadante de cultivo de células 293F en el que se han introducido pFUSE-CHIg-HuK5-70 y pFUSE2-CLIg-HuK5-70. Para la detección de las proteínas de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo HuK5-70, se usó un anticuerpo $F(ab')^2$ anti-IgG humano marcado con biotina (Rockland). El carril 3 indica un sobrenadante de cultivo de células 293F en las que se habían introducido pFUSE-CHIg-HuT6-16-1 y pFUSE2-CLIg-HuT6-16 y el carril 4 indica un sobrenadante de cultivo de células 293F en las que se habían introducido pFUSE-CHIg-HuT6-16-2 y pFUSE2-CLIg-HuT6-16. Las proteínas de cadena pesada del anticuerpo HuT6-16-1 y el anticuerpo HuT6-16-2 se detectaron con un anticuerpo Fc anti-IgG humano marcado con biotina (Rockland), mientras que las proteínas de cadena ligera del anticuerpo HuT6-16-1 y el anticuerpo HuT6-16-2 se detectaron con un anticuerpo $F(ab')^2$ anti-IgG humano marcado con biotina (Rockland).

Como resultado, en todos los casos del anticuerpo HuK5-70, el anticuerpo HuT6-16-1 y el anticuerpo HuT6-16-2, se confirmó la expresión de proteínas de cadena pesada y cadena ligera en cada sobrenadante de cultivo.

Por otra parte, la Figura 51 muestra los resultados obtenidos al cargar el anticuerpo HuK5-70, anticuerpo HuT6-16-1 y anticuerpo HuT6-16-2 purificados en SDS-PAGE y después teñirlos con CBB. En todos los casos, se detectaron una cadena pesada de aproximadamente 50 kD y una cadena ligera de aproximadamente 25 kD en condiciones reductoras y se confirmaron las bandas en las mismas posiciones que la cadena pesada y la cadena ligera detectadas por la transferencia Western descrita anteriormente. A partir de estos resultados, se confirmó que se generaba una proteína de anticuerpo HuK5-70, una proteína de anticuerpo HuT6-16-1 y una proteína de anticuerpo HuT6-16-2.

[Ejemplo 35]

[Afinidad antigénica del anticuerpo K5-70 humanizado (HuK5-70) y los anticuerpos T6-16 humanizados (HuT6-16-1 y HuT6-16-2)]

La afinidad antigénica del anticuerpo HuK5-70, anticuerpo HuT6-16-1 y anticuerpo HuT6-16-2 purificados se examinaron por métodos que usan FACS y ELISA.

FACS se llevó a cabo, usando células HEK293-hTROP-2 en las que un gen de TROP-2 humano de longitud completa se expresó de manera estable en células HEK293 y una línea celular de cáncer de páncreas PK-59 que expresó de manera endógena una proteína TROP-2 humana en la superficie celular. Se añadieron 100 µl de una solución de anticuerpo utilizada como anticuerpo primario, que se había diluido a 1 µg/ml con un medio que contenía FCS al 10 %, a una suspensión (5×10^5 células) de células (células HEK293-hTROP-2 o células PK-59), que se había retirado de una placa de cultivo mediante tratamiento con tripsina, y la mezcla obtenida se incubó a 4 ºC durante 20 minutos. A continuación, el resultante se lavó con 1 ml de un medio que contenía FCS al 10 %. Después, se añadió anticuerpo secundario (100 µl cada uno), en el que un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen) o un anticuerpo Fc anti-IgG humano marcado con biotina (Rockland) se diluyó hasta 200 veces o 2000 veces, respectivamente, al resultante. La mezcla obtenida se incubó a 4 °C durante 20 minutos y después se lavó de nuevo con 1 ml de un medio que contenía FCS al 10 %. En un caso en el que se usó el anticuerpo Fc anti-IgG humano marcado con biotina como anticuerpo secundario, se añadieron 100 µl de una solución de marcaje, en la que la PE marcada con estreptavidina (BD Pharmingen) se diluyó hasta 400 veces, a la misma como un reactivo de marcaje con fluorescencia. A continuación, la mezcla obtenida se incubó a 4 °C durante 20 minutos y después se lavó con 1 ml de un medio que contenía FCS al 10 %. Posteriormente, la muestra que contenía células marcadas se suspendió en 1 ml de PBS que contenía FCS al 1 % y EDTA 2 mM y la suspensión obtenida se analizó después usando FACSCalibur (Becton Dickinson). Como resultado, se descubrió que el anticuerpo HuK5-70 mostraba reactividad equivalente a la de un anticuerpo K5-70 de ratón tanto en las células HEK293-hTROP-2 como en las células PK-59. De forma análoga, el anticuerpo HuT6-16-1 y el anticuerpo HuT6-16-2 mostraron reactividad equivalente a la de un anticuerpo T6-16 (Figura 52).

Asimismo, la afinidad antigénica también se examinó mediante un método de ELISA. Se llevó a cabo ELISA usando una placa de ELISA que se recubrió con la proteína recombinante de la región extracelular de hTROP-2 como se describe en el Ejemplo 3. Específicamente, una placa de 96 pocillos (BD FALCON) se recubrió con una proteína recombinante de 50 µl/pocillo de una región extracelular de hTROP-2 que se había diluido con PBS a 0,5 µg/ml (a 4 °C durante una noche). A continuación, el resultante se lavó con un tampón de lavado (PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %) y después se añadió al mismo un tampón de bloqueo (PBS que contenía leche desnatada al 2 % y Tween 20 al 0,05 %) (200 µl/pocillo) para bloquearlo (a temperatura ambiente durante 1 hora). El resultante se lavó con un tampón de lavado. A continuación, se diluyeron un anticuerpo HuK5-70, un anticuerpo HuT6-16-1, un anticuerpo HuT6-16-2, un anticuerpo K5-70 y un anticuerpo T6-16 con un tampón de ELISA (PBS que contenía leche desnatada al 1 % y Tween 20 al 0,025 %) en un intervalo de concentración de $3{,}05 \times 10^{-4}$ a 5 µg/ml, para preparar una serie de muestras de dilución doble. Las muestras de dilución obtenidas se añadieron cada una en una cantidad de 50 µl/pocillo a la placa de ELISA descrita anteriormente (a temperatura ambiente durante 2 horas). El producto de reacción se lavó con un tampón de lavado y, a continuación, se añadió un anticuerpo de cabra anti-cadena k humana marcado con HRP (SouthernBiotech) o un anticuerpo anti-IgG de ratón de oveja marcado con HRP (GE Healthcare), cada uno de los cuales se había diluido hasta 2000 veces con un tampón de ELISA, (50 µl/pocillo) como anticuerpo de detección al

producto de reacción (a temperatura ambiente durante 1 hora). Después de lavar la mezcla con un tampón de lavado, se añadió una solución de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina: SIGMA) (50 µl/pocillo) al resultante para llevar a cabo una reacción de color. Después, se añadió ácido sulfúrico 1 M (25 µl/pocillo) al producto de reacción para terminar la reacción. Usando el lector de microplacas modelo 550 (BioRad), se midió una absorbancia a 450 nm con una absorbancia a 655 nm usada como referencia. Como resultado, las curvas de reacción de K5-70 y HuK5-70 eran casi solapantes entre sí y los valores de CE50 de las mismas fueron de 27 ng/ml y 22 ng/ml, respectivamente (Figura 53). Además, las curvas de reacción de T6-16, HuT6-16-1 y HuT6-16-2 eran casi solapantes entre sí y los de CE50 de las mismas eran 30 ng/ml, 27 ng/ml y 27 ng/ml, respectivamente (Figura 54). A partir de estos resultados, resultó evidente que todos del anticuerpo HuK5-70, el anticuerpo HuT6-16-1 y el anticuerpo HuT6-16-2 presentan afinidad antigénica equivalente a la del anticuerpo K5-70 o T6-16 que es un anticuerpo original antes de la humanización.

[Ejemplo 36]

[Actividad antitumoral del anticuerpo anti-hTROP-2 humanizado (HuK5-70) *in vivo*]

Posteriormente, la actividad antitumoral de un anticuerpo HuK5-70 *in vivo* se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de colon humano SW480, que expresa de manera endógena TROP-2 humano en la superficie celular. Se trasplantaron células SW480 (5 x 10^6 células) por vía subcutánea en el flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid hembra de 7 semanas de edad (Día 1). Cuando el volumen tumoral medio alcanzó 100 mm^3, se llevó a cabo agrupación (Día 9). Desde el día 9, se llevó a cabo administración intraperitoneal del anticuerpo a intervalos de administración de una vez cada tres días. En el 39º día después del trasplante de células de cáncer (Día 39), el volumen tumoral de un grupo de control (administración de PBS, N = 8) fue de 824,3 ± 188,8 mm^3. Por otro lado, el volumen tumoral de un grupo de administración del anticuerpo HuK5-70 (10 mg/kg de peso corporal, N = 8) fue de 455,5 ± 208,6 mm^3 ($P < 0,01$ por la prueba de t de Student) y, por tanto, se inhibió significativamente la formación de tumores en el grupo de administración del anticuerpo HuK5-70 (tasa inhibidora: 44,7 %) (Figura 55A). Con respecto al peso tumoral, el peso tumoral del grupo de control fue de 0,509 ± 0,161 g. Por el contrario, en el grupo de administración del anticuerpo HuK5-70, el peso tumoral del grupo de control fue de 0,272 ± 0,162 g ($P < 0,05$ por la prueba de t de Student), mostrando una tasa inhibidora del 46,6 % (Figura 55B).

[Ejemplo 37]

[Actividad antitumoral dependiente de la dosis de anticuerpos anti-hTROP-2 humanizados (HuK5-70 y HuT6-16-2) en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando la línea celular de cáncer de colon humano SW480]

La actividad antitumoral dependiente de la dosis de los anticuerpos HuK5-70 y HuT6-16-2 se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de colon humano SW480. Se trasplantaron células SW480 (5 x 10^6 células) por vía subcutánea en el flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid hembra de 7 semanas de edad (Día 1). En el 9º día después del trasplante de células cancerosas (Día 9) en el que el volumen tumoral medio alcanzó 100 mm^3, los ratones se dividieron en un grupo de control (grupo de administración de PBS, N = 8, 101,65 ± 8,35 mm^3), un grupo de administración del anticuerpo HuK5-70 de 1 mg/kg de peso corporal (N = 8, 103,18 ± 9,86 mm^3), un grupo de administración del anticuerpo HuK5-70 de 5 mg/kg de peso corporal (N = 8, 101,34 ± 8,94 mm^3), un grupo de administración del anticuerpo HuK5-70 de 10 mg/kg de peso corporal (N = 8, 101,53 ± 8,98 mm^3), un grupo de administración del anticuerpo HuT6-16-2 de 1 mg/kg de peso corporal (N = 8, 103,18 ± 9,86 mm^3), un grupo de administración del anticuerpo HuT6-16-2 de 5 mg/kg de peso corporal (N = 8, 101,34 ± 8,94 mm^3) y un grupo de administración del anticuerpo HuT6-16-2 de 10 mg/kg de peso corporal (N = 8, 101,53 ± 8,98 mm^3). Después, a partir del día 9, se llevó a cabo administración intraperitoneal de cada anticuerpo a intervalos de administración de una vez cada tres días. En el 48º día después del trasplante de células de cáncer (Día 48), el volumen tumoral del grupo de control fue de 754,67 ± 276,05 mm^3. Por otro lado, en los grupos de administración del anticuerpo HuK5-70, el volumen tumoral del grupo de administración de 1 mg/kg de peso corporal fue de 521,81 ± 183,45 mm^3 (tasa inhibidora: 30,9 %), el volumen corporal del grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal fue de 258,78 ± 137,02 mm^3 (tasa inhibidora: 65,7 %, $P < 0,01$ por la prueba de t de Student) y el peso tumoral del grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal fue de 314,60 ± 152,89 mm^3 (tasa inhibidora: 58,3 %, $P < 0,01$ por la prueba de t de Student) (Figura 56A). En los grupos de administración del anticuerpo HuT6-16-2, el volumen tumoral del grupo de administración de 1 mg/kg de peso corporal fue de 600,41 ± 319,84 mm^3 (tasa inhibidora: 20,4 %), el volumen tumoral del grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal fue de 315,32 ± 189,02 mm^3 (tasa inhibidora: 58,2 %, $P < 0,01$ por la prueba de t de Student) y el peso tumoral del grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal fue de 270,79 ± 266,71 mm^3 (tasa inhibidora: 64,1 %, $P < 0,01$ por la prueba de t de Student) (Figura 57A). Con respecto al peso tumoral el día 48, el peso tumoral del grupo de control fue de 0,422 ± 0,201 g. Por otro lado, en los grupos de administración del anticuerpo HuK5-70, el peso tumoral del grupo de administración de 1 mg/kg de peso corporal fue de 0,301 ± 0,160 g (tasa inhibidora: 28,7 %), el peso tumoral del grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal fue de 0,115 ± 0,083 g (tasa inhibidora: 72,7 %, $P < 0,01$ por la prueba de t de Student) y el peso tumoral del grupo de administración de 10 mg/kg de peso corporal fue de 0,244 ± 0,181 g (tasa inhibidora: 42,2 %) (Figura 56B). En los grupos de administración del anticuerpo HuT6-16-2, el peso tumoral del grupo de administración de 1 mg/kg de peso corporal fue de 0,422 ± 0,255 g (tasa inhibidora: 0 %), el peso tumoral del grupo de administración de 5 mg/kg de peso corporal fue de 0,247 ± 0,151 g (tasa inhibidora: 41,5 %) y el peso tumoral del grupo de

administración de 10 mg/kg de peso corporal fue de 0,190 ± 0,190 g (tasa inhibidora: 53,1 %, P < 0,01 por la prueba de t de Student) (Figura 57B). A partir de estos resultados, se confirmó que los anticuerpos HuK5-70 y HuT6-16-2 tienen actividad antitumoral dependiente de la dosis.

[Ejemplo 38]

[Actividad antitumoral de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-hTROP-2 K5-70 y T6-16 en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando la línea celular de cáncer de ovario humano SK-OV-3]

La actividad antitumoral de los anticuerpos K5-70 y T6-16 como anticuerpos originales *in vivo* se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de ovario humano SK-OV-3, que expresa de manera endógena hTROP-2 en la superficie celular. Se trasplantaron células SK-OV-3 (5 x 10^6 células) por vía subcutánea en el flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid desnudos hembra de 7 semanas de edad (Día 1). En el 11er día después del trasplante de células de cáncer (Día 11), los ratones individuales, en los que se observó formación evidente de tumor (volumen tumoral medio: aproximadamente 50 mm^3), se dividieron en grupos. Después, a partir del día 11, se llevó a cabo administración intraperitoneal de cada anticuerpo a intervalos de administración de dos veces por semana. En el 56º día después del trasplante de células de cáncer (Día 56), el volumen tumoral de un grupo de control (administración de PBS, N = 8) fue de 652,6 ± 349,1 mm^3. Por otro lado, el volumen tumoral de un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal, N = 8) fue de 253,7 ± 137,3 mm^3 (P < 0,01 por la prueba de t de Student) y, por tanto, se inhibió significativamente la formación de tumores (tasa inhibidora: 61,1 %); y el volumen tumoral de un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (10 mg/kg de peso corporal, N = 8) fue de 214,6 ± 98,6 mm^3 (P < 0,01 por la prueba de t de Student) y, por tanto, se inhibió significativamente la formación de tumores (tasa inhibidora: 67,1 %) (Figura 58A). Con respecto al peso tumoral, el peso tumoral del grupo de control fue de 0,413 ± 0,218 g. Por el contrario, el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo K5-70 fue de 0,194 ± 0,112 (g) (P < 0,05 por la prueba de t de Student), mostrando una tasa inhibidora de 53,0 %; y el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo T6-16 fue de 0,183 ± 0,093 (g) (P < 0,05 por la prueba de t de Student), mostrando una tasa inhibidora de 55,7 % (Figura 58B).

[Ejemplo 39]

[Actividad antitumoral de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-hTROP-2 K5-70 y T6-16 en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468]

De forma análoga, la actividad antitumoral de los anticuerpos K5-70 y T6-16 *in vivo* se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468, que expresa de manera endógena hTROP-2 en la superficie celular. Se trasplantaron células MDA-MB-468 (5 x 10^6 células) por vía subcutánea en el flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid desnudos hembra de 7 semanas de edad (Día 1). En el 12er día después del trasplante de células de cáncer (Día 12), los ratones individuales, en los que se observó formación evidente de tumor (volumen tumoral medio: aproximadamente 50 mm^3), se dividieron en grupos. Después, a partir del día 12, se llevó a cabo administración intraperitoneal de cada anticuerpo a intervalos de administración de dos veces por semana. En el 54º día después del trasplante de células de cáncer (Día 54), el volumen tumoral de un grupo de control (administración de PBS, N = 8) fue de 218,6 ± 75,5 mm^3. Por otro lado, el volumen tumoral de un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal, N = 8) fue de 70,2 ± 37,4 mm^3 (P < 0,01 por la prueba de t de Student) y, por tanto, se inhibió significativamente la formación de tumores (tasa inhibidora: 67,9 %); y el volumen tumoral de un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (10 mg/kg de peso corporal, N = 8) fue de 88,3 ± 42,9 mm^3 (P < 0,01 por la prueba de t de Student) y, por tanto, se inhibió significativamente la formación de tumores (tasa inhibidora: 59,6 %) (Figura 59A). Con respecto al peso tumoral el día 54, el peso tumoral del grupo de control fue de 0,142 ± 0,049 g. Por el contrario, el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo K5-70 fue de 0,050 ± 0,033 (g) (P < 0,01 por la prueba de t de Student), mostrando una tasa inhibidora de 64,8 %; y el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo T6-16 fue de 0,077 ± 0,046 (g) (P < 0,05 por la prueba de t de Student), mostrando una tasa inhibidora de 45,8 % (Figura 59B).

[Ejemplo 40]

[Actividad antitumoral de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-hTROP-2 K5-70 y T6-16 en modelos de tratamiento con xenoinjerto usando la línea celular de cáncer de pulmón humano Calu-3]

De forma análoga, la actividad antitumoral de los anticuerpos K5-70 y T6-16 *in vivo* se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de pulmón humano Calu-3, que expresa de manera endógena hTROP-2 en la superficie celular. Se trasplantaron células Calu-3 (5 x 10^6 células) por vía subcutánea en el flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid desnudos hembra de 7 semanas de edad (Día 1). En el 9º día después del trasplante de células de cáncer (Día 9), los ratones individuales, en los que se observó formación evidente de tumor (volumen tumoral medio: aproximadamente 100 mm^3), se dividieron en grupos. Después, a partir del día 9, se llevó a cabo administración intraperitoneal de cada anticuerpo a intervalos de administración de dos veces por semana. En el 41er día después del trasplante de células de cáncer (Día 41), el volumen tumoral de un grupo de control (administración de PBS, N = 8) fue de 395,7 ± 221,2 mm^3. Por otro lado, el volumen tumoral de un grupo de

administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal, N = 8) fue de 120,7 ± 125,6 mm^3 (P < 0,01 por la prueba de t de Student) y, por tanto, se inhibió significativamente la formación de tumores (tasa inhibidora: 69,5 %); y el volumen tumoral de un grupo de administración del anticuerpo T6-16 (10 mg/kg de peso corporal, N = 8) fue 146,3 + 128,4 mm^3 (P < 0,05 por la prueba de t de Student) y, por tanto, se inhibió significativamente la formación de tumores (tasa inhibidora: 63,0 %) (Figura 60A). Con respecto al peso tumoral, el peso tumoral del grupo de control fue de 0,301 ± 0,189 g. Por el contrario, el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo K5-70 fue de 0,08 ± 0,085 (g) (P < 0,01 por la prueba de t de Student), mostrando una tasa inhibidora de 73,5 %; y el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo T6-16 fue de 0,106 ± 0,096 (g) (P < 0,05 por la prueba de t de Student), mostrando una tasa inhibidora de 64,9 % (Figura 60B).

[Ejemplo 41]

[Actividad antitumoral del anticuerpo monoclonal de ratón anti-hTROP-2 K5-70 en modelos de prevención de xenoinjerto usando la línea celular de cáncer de conducto biliar humano TFK-1]

De forma análoga, la actividad antitumoral de un anticuerpo K5-70 *in vivo* se examinó con modelos de tratamiento con xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de conducto biliar humano TFK-1, que expresa de manera endógena hTROP-2 en la superficie celular. Se trasplantaron células TFK-1 (5 x 10^6 células) por vía subcutánea en el flanco derecho de cada uno de los ratones NOD-scid desnudos hembra de 7 semanas de edad (Día 1) y, a partir del mismo día, se inició administración intraperitoneal del anticuerpo a intervalos de administración de dos veces por semana. En el 31er día después del trasplante de células de cáncer (Día 31), el volumen tumoral de un grupo de control (administración de PBS, N = 5) fue de 1000,4 ± 268,9 mm^3. Por otro lado, el volumen tumoral de un grupo de administración del anticuerpo K5-70 (10 mg/kg de peso corporal, N = 5) fue de 197,2 ± 215,5 mm^3 (P < 0,01 por la prueba de t de Student) y, por tanto, se inhibió significativamente la formación de tumores (tasa inhibidora: 80,3 %) (Figura 61A). Con respecto al peso tumoral, el peso tumoral del grupo de control fue de 0,443 ± 0,070 g. Por el contrario, el peso tumoral del grupo de administración del anticuerpo K5-70 fue de 0,063 ± 0,052 (g) (P < 0,01 por la prueba de t de Student), mostrando una tasa inhibidora de 85,8 % (Figura 61B).

[Ejemplo 42]

[Análisis de la avidez de los anticuerpos HuK5-70 y HuT6-16-2]

Se examinó la actividad de unión a antígeno de los anticuerpos HuK5-70 y HuT6-16-2 según un método de ELISA (ELISA recubierto con antígeno de baja densidad) usando una placa de 96 pocillos que se ha recubierto con un antígeno de baja densidad. Una proteína recombinante hTACSTD2-Fc-His (Creative BioMart), que se había preparado a una concentración de 0,1 µg/ml con un tampón de acetato 0,1 M (pH 5,3), se añadió en una cantidad de 50 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos y se llevó a cabo recubrimiento a 4 °C durante una noche. A continuación, se realizó el mismo análisis que en el Ejemplo 40. Los anticuerpos de ensayo se diluyeron con un tampón de ELISA (PBS que contenía leche desnatada al 1 % y Tween 20 al 0,025 %), para preparar muestras con un intervalo de concentración de 20 µg/ml a una serie de diluciones dobles (15 muestras) y para usarlos. Como resultado, se descubrió que el anticuerpo HuT6-16-2 tenía actividad de unión que era casi equivalente a la del anticuerpo T6-16 (en donde sus valores de CE50 eran de 49 ng/ml y 41 ng/ml, respectivamente), pero que el valor de CE50 del anticuerpo HuK5-70 era aproximadamente 20 veces mayor que el del anticuerpo K5-70 (en donde sus valores de CE50 eran de 222 ng/ml y 12 ng/ml, respectivamente; Figura 62).

Posteriormente, se examinó la actividad de unión a antígeno de los anticuerpos HuK5-70 y K5-70 mediante ELISA para analizar una reacción de antígeno-anticuerpo monovalente. Se añadieron anti-IgG humano de cabra (específico de Fcγ) (Southern Biotech) que se había diluido a 1 µg/ml con un tampón de acetato 0,1 M (pH 5,3) y anti-IgG de ratón de cabra (específico de cadena γ) (Southern Biotech) que se había diluido a 3 µg/ml en cada cantidad de 50 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos. A continuación, se llevó a cabo recubrimiento a 4 °C durante una noche. A continuación, el producto de reacción se lavó con un tampón de lavado (PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %) y después se añadió al mismo un tampón de bloqueo (PBS que contenía leche desnatada al 2 % y Tween 20 al 0,05 %) (200 µl/pocillo) para bloquearlo (a temperatura ambiente durante 1 hora). El resultante se lavó con un tampón de lavado. A continuación, el anticuerpo de ensayo, que se había diluido a 1 µg/ml con un tampón de ELISA (PBS que contenía leche desnatada al 1 % y Tween 20 al 0,025 %), se añadió en una cantidad de 50 µl/pocillo a la placa descrita anteriormente. Durante esta operación, se añadió un anticuerpo HuK5-70 a un pocillo recubierto con anti-IgG humano de cabra (específico de Fcγ) y se añadió un anticuerpo K5-70 a un pocillo recubierto con anti-IgG de ratón de cabra (específico de cadena γ). La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora y el producto de reacción se lavó después con un tampón de lavado. La proteína recombinante de la región extracelular de hTROP-2 descrita en el Ejemplo 3 (hTROP-2 EC) se diluyó con un tampón de ELISA para preparar muestras con un intervalo de concentraciones de 5 µg/ml a una serie de diluciones triples (10 muestras). La muestra obtenida de este modo se añadió en cada cantidad de 50 µl/pocillo a la placa. La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora y el producto de reacción se lavó después con un tampón de lavado. Después, se añadió anti-His (G-18) (Santa Cruz), que se había diluido a 2 µg/ml con un tampón de ELISA, como anticuerpo primario al producto de reacción (50 µl/pocillo). La mezcla obtenida se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavó con un tampón de lavado. A continuación, se añadió anti-IgG de conejo marcada con HRP (GE Healthcare), que se había

diluido hasta 1000 veces con un tampón de ELISA, como anticuerpo secundario al producto de reacción (50 µl/pocillo). La mezcla obtenida se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavó con un tampón de lavado. A continuación, se añadió una solución de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina: SIGMA) en una cantidad de 50 µl/pocillo al resultante para llevar a cabo una reacción de color. Después, se añadió ácido sulfúrico 1 M (25 µl/pocillo) al producto de reacción para terminar la reacción. Usando el lector de microplacas modelo 550 (BioRad), se midió una absorbancia a 450 nm con una absorbancia a 655 nm usada como referencia. Como resultado, los valores de CE50 calculados a partir de las curvas de unión de la proteína hTROP-2EC con los anticuerpos K5-70 y HuK5-70 fueron de 7 ng/ml y 6 ng/ml, respectivamente (Figura 63). Estos resultados demostraron que el anticuerpo HuK5-70 y el anticuerpo K5-70 tienen afinidad de antígeno equivalente en una reacción de antígeno-anticuerpo monovalente.

Como se describe en el Ejemplo 40, en un método de ELISA que usa una placa de 96 pocillos que se había recubierto con un antígeno de alta densidad (0,5 µg/ml) (ELISA recubierto con antígeno), la afinidad antigénica del anticuerpo K5-70 era equivalente a la afinidad antigénica del anticuerpo HuK5-70 (Figura 53). Por tanto, se consideró que la actividad de unión a antígeno del anticuerpo HuK5-70 que es relativamente menor que la del anticuerpo K5-70 en un método de ELISA, en el que se ha recubierto una placa con un antígeno de baja densidad (0,1 µg/ml), puede estar provocada por el hecho de que la flexibilidad del movimiento de dos ramas de unión a antígeno, en concreto, la "avidez" es relativamente menor en el anticuerpo HuK7-50 que en el anticuerpo K5-70.

[Ejemplo 43]

[Preparación y caracterización de mutantes de anticuerpos humanizados K5-70]

Con el fin de mejorar la "avidez" de un anticuerpo HuK5-70, se llevó a cabo el siguiente experimento.

El siguiente experimento examinó si la "avidez" relativamente baja mencionada anteriormente del anticuerpo HuK5-70 está provocada por VH o por VL. En primer lugar, se prepararon genes que codificaban la región variable de cadena H (K5-70 VH) y la región variable de cadena L (K5-70 VL) de un anticuerpo K5-70 como anticuerpo original mediante síntesis génica (Operón). Durante la síntesis génica, se añadió una secuencia de Kozak (ACC ACC) al lado 5'-terminal de la secuencia génica de cada uno de los K5-70 VH y K5-70 VL. Además, se añadió un sitio EcoRI (GAA TTC) como un sitio de enzima de restricción al extremo 5' del K5-70 VH y se añadió un sitio NheI (GCT AGC) como un sitio de enzima de restricción al extremo 3' del mismo. De forma análoga, se añadió un sitio AgeI (ACC GGT) como sitio de enzima de restricción al extremo 5' del K5-70 VL y se añadió un sitio BsiWI (CGT ACG) como un sitio de enzima de restricción al extremo 3' del mismo. El gen K5-70 VH y el gen K5-70 VL sintetizados de este modo se incorporaron cada uno en un vector pCR2.1 (Invitrogen). Las secuencias de genes de los K5-70 VH y VL preparados por la síntesis génica se muestran en la Figura 64 y la Figura 65, respectivamente. Los genes de K5-70 VH y K5-70 VL incorporados en el vector pCR2.1 se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y NheI, y AgeI y BsiWI, respectivamente, y después se recuperaron fragmentos de genes. Posteriormente, el gen de K5-70 VH escindido se insertó en el sitio EcoRI/NheI de un vector pFUSE-CHIg-hG1 (InvivoGen) como un vector de expresión para la expresión de una forma de IgG1 humana, mientras que el gen de K5-70 VL se insertó en el sitio AgeI/BsiWI de un vector pFUSE2-CLIg-hk (InvivoGen) como un vector de expresión de forma de Igκ humana, completando de este modo construcciones quiméricas de ser humano-ratón (pFUSE-CHIg-MuK5-70 y pFUSE2-CLIg-MuK5-70).

Se permitió que las construcciones preparadas de este modo y el vector de expresión de cadena H HuK5-70 (pFUSE-CHIg-HuK5-70) y el vector de expresión de cadena L HuK5-70 (pFUSE2-CLIg-HuK5-70), que se habían preparado en el Ejemplo 36, se coexpresaron en células 293F (Invitrogen) mediante combinaciones 1 a 4 en la siguiente tabla.

	Cadena H	Cadena L	Anticuerpo generado	Comentarios
1	pFUSE-CHIg-HuK5-70	pFUSE2-CLIg-HuK5-70	anticuerpo HuK5-70	Anticuerpo humanizado K5-70
2	pFUSE-CHIg-HuK5-70	pFUSE2-CLIg-MuK5-70	Anticuerpo HuVH/MuVL	K5-70 VH humanizado/K5-70 VL de ratón
3	pFUSE-CHIg-MuK5-70	pFUSE2-CLIg-HuK5-70	Anticuerpo MuVH/HuVL	K5-70 VH de ratón/K5-70 VL humanizado
4	pFUSE-CHIg-MuK5-70	pFUSE2-CLIg-MuK5-70	anticuerpo ChK5-70	Anticuerpo quimérico K5-70

Se llevó a cabo transfección de los vectores de expresión descritos anteriormente en células 293F (Invitrogen) usando el reactivo NeoFection (Astec) de acuerdo con el método descrito en las instrucciones incluidas con el mismo. Después de finalizar la transfección, el producto resultante se cultivó durante 5 días usando medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen) a 37 °C en una incubadora de CO_2 con una concentración de CO_2 del 8 %. A continuación, se recuperó un sobrenadante de cultivo. La concentración de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo se midió mediante un método de ELISA de tipo sándwich. Específicamente, se añadió anti-IgG humano de cabra (específico de Fcγ) (Southern Biotech), que se había diluido a 1 µg/ml con PBS, en una cantidad de 50 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos. A continuación, se llevó a cabo recubrimiento a 4 °C durante una noche. A continuación, el producto de reacción se

lavó con un tampón de lavado (PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %) y después se añadió al mismo un tampón de bloqueo (PBS que contenía leche desnatada al 2 % y Tween 20 al 0,05 %) (200 µl/pocillo) para bloquearlo a temperatura ambiente durante 1 hora. El resultante se lavó con un tampón de lavado. A continuación, se añadió un sobrenadante de cultivo, que se había diluido a un aumento de dilución apropiado con un tampón de ELISA (PBS que contenía leche desnatada al 1 % y Tween 20 al 0,025 %), en una cantidad de 50 µl/pocillo a la placa descrita anteriormente y después se llevó a cabo una reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Como preparación convencional, se usó un anticuerpo HuK5-70. El producto de reacción se lavó después con un tampón de lavado. Como anticuerpo de detección, se añadió anti-kappa humana de cabra marcado con HRP (específico de cadena k) (Southern Biotech), que se había diluido hasta 1.000 veces con un tampón de ELISA, en una cantidad de 50 µl/pocillo al producto de reacción y después se llevó a cabo una reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. El producto de reacción se lavó con un tampón de lavado y, a continuación, se añadió una solución de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina: SIGMA) en una cantidad de 50 µl/pocillo al resultante para llevar a cabo una reacción de color. Después, se añadió ácido sulfúrico 1 M (25 µl/pocillo) al producto de reacción para terminar la reacción. Usando el lector de microplacas iMark (BioRad), se midió una absorbancia a 450 nm con una absorbancia a 655 nm usada como referencia. La unión de los 4 tipos de anticuerpos contenidos en los sobrenadantes de cultivo a hTROP-2 se midió mediante el ELISA recubierto con antígeno de baja densidad descrito anteriormente. Como resultado, se descubrió que la actividad de unión de un anticuerpo MuVH/HuVL constituido con K5-70 VH de ratón y HuK5-70 VL a hTROP-2 era equivalente a la de un anticuerpo ChK5-70, pero que la actividad de unión de un anticuerpo HuVH/MuVL constituido con HuK5-70 VH y K5-70 VL de ratón era relativamente menor que la del ChK5-70 (Figura 66). Estos resultados sugirieron que HuK5-70 VH está implicado en la "avidez" de HuK5-70. Por lo tanto, para preparar anticuerpos modificados, en los que se ha mejorado la "avidez" del anticuerpo Huk5-70, se llevó a cabo sustitución de aminoácidos en el HuK5-70 VH. Como se encuentra a partir de una alineación de las secuencias de aminoácidos de HuK5-70 VH y K5-70 VH como se muestra en la Figura 41, un total de 17 aminoácidos con los números de aminoácidos 5, 7, 11, 12, 13, 20, 38, 40, 44, 73, 75, 81, 82c, 83, 87, 108 y 109 son diferentes entre HuK5-70 VH y K5-70 VH (en donde los números de aminoácidos se usan de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al*. (1991)). Los aminoácidos mencionados anteriormente de HuK5-70 VH se sustituyeron con los aminoácidos correspondientes de K5-70 VH, de modo que se prepararon mutantes según la síntesis génica. Después, se preparó un vector de expresión (un mutante pFUSE-CHIg-HuK5-70). Según el informe de Landolfi *et al*. (J. Immunol. 166: 1748, 2001), se ha informado de que los aminoácidos en las posiciones 11 y 38 de VH están implicados en la avidez de un anticuerpo humanizado y que la avidez y la actividad biológica se mejoran sustituyendo los dos aminoácidos anteriores con los aminoácidos correspondientes procedentes del ratón. Por lo tanto, también se preparó un mutante doble que comprendía la sustitución de los aminoácidos en las posiciones 11 y 38. Los nombres de los 18 tipos de mutantes de HuK5-70 VH preparados de este modo y sus secuencias de aminoácidos se muestran en la Figura 67.

Los 18 tipos preparados de mutantes de HuK5-70 VH (vectores de expresión para mutantes pFUSE-CHIg-HuK5-70) se combinaron cada uno con un vector de expresión de cadena L de HuK5-70 (pFUSE2-CLIg-HuK5-70) y cada uno de los vectores de expresión obtenidos de este modo se transfectó en células HEK293. Después, usando el sobrenadante de cultivo obtenido, la actividad de unión de cada anticuerpo de sustitución de aminoácidos a hTROP-2 se examinó mediante ELISA recubierto con antígeno de baja densidad. Como resultado, entre los 18 tipos de mutantes de HuK5-70 VH, se observó que un mutante R44G, en el que la R (arginina) en la posición 44 de HuK5-70 VH se había sustituido con G (glicina) (HuK5-70 R44G; que en lo sucesivo se denominará HuK5-70-2), tenía una actividad de unión a antígeno evidentemente mejorada (Figura 68). La secuencia de un gen de HuK5-70 VH R44G (en lo sucesivo en el presente documento denominado HuK5-70 VH2) se muestra en la Figura 69.

[Ejemplo 44]

[Purificación y caracterización del anticuerpo HuK5-70-2]

El anticuerpo HuK5-70-2 que es un anticuerpo mutante HuK5-70 R44G se purificó de la siguiente manera. Es decir, pFUSE-CHIg-HuK5-70 R44G y pFUSE2-CLIg-HuK5-70 se transfectaron en células 293F y el resultante se cultivó después durante 5 días. A continuación, se recuperó un sobrenadante de cultivo. El anticuerpo HuK5-70-2 se purificó del sobrenadante de cultivo recuperado, usando rProtein A sepharose Fast Flow (GE Healthcare). El anticuerpo HuK5-70-2 purificado se cargó en SDS-PAGE en condiciones reductoras. Como resultado, se encontraron una cadena H de aproximadamente 50 kDa y una cadena L de aproximadamente 25 kDa. La pureza de cada anticuerpo fue del 95 % o más (Figura 70).

La actividad de unión de los anticuerpos HuK5-70-2 y HuK5-70 purificados contra hTROP-2 se examinó mediante ELISA recubierto con antígeno de alta densidad y ELISA recubierto con antígeno de baja densidad. La afinidad de los anticuerpos se examinó mediante el ELISA recubierto con antígeno de alta densidad (usando una placa de 96 pocillos que se recubrió con 1 µg/ml de hTROP-2). Como resultado, se descubrió que la curva de unión del anticuerpo HuK5-70 era casi solapante con la curva de unión del anticuerpo HuK5-70-2 y que su afinidad era equivalente entre sí. Posteriormente, la avidez de los anticuerpos se examinó mediante el ELISA recubierto con antígeno de baja densidad (usando una placa de 96 pocillos que se recubrió con 0,1 µg/ml de hTROP-2). Como resultado, se descubrió que, como el caso con el uso de un sobrenadante de cultivo, la actividad de unión a antígeno del anticuerpo HuK5-70-2 fue claramente mayor que la actividad de unión a antígeno del anticuerpo HuK5-70 (Figura 71). Específicamente, el valor de CE_{50} de un anticuerpo K5-70 fue de 11,4 ng/ml, el de un anticuerpo HuK5-70 fue de 33,4 ng/ml y el de un anticuerpo

HuK5-70-2 fue de 11,4 ng/ml. Por tanto, se demostró que el anticuerpo HuK5-70-2 tiene una avidez mejorada en comparación con el anticuerpo HuK5-70 y que el anticuerpo HuK5-70-2 tiene actividad equivalente a la del anticuerpo K5-70.

[Ejemplo 45]

[Medición de la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de anticuerpos anti-hTROP-2 humanizados]

(1) Preparación de solución de células diana

Como células diana, se usaron una línea celular de cáncer de colon humano SW480, una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59 y una línea celular de cáncer de próstata humano PC-3, cada una de los cuales expresa de forma endógena hTROP-2. Se recogieron células diana cultivadas en una placa de cultivo celular de 10 cm de la placa mediante tratamiento con tripsina y después se suspendieron en un medio de ensayo. Un medio Leivovitz L-15 (para células SW480) o un medio RPMI-1640 (para células PK-59 y PC-3), al que se añadió FBS al 0,5 %, se usó para ensayo de ADCC. Después de terminar la centrifugación (a 1000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente), se prepararon sedimentos a una densidad celular de 2 x 10^5 células/ml con el mismo medio que el usado anteriormente y por tanto se preparó una solución de células diana.

(2) Separación de células mononucleares de sangre periférica humana

Se recogió sangre venosa sana con heparina y después se diluyó a 2 veces con PBS. A continuación, la sangre diluida se colocó en capas sobre Lymphoprep (Daiichi Kagaku Yakuhin KK) y después se centrifugó (a temperatura ambiente a 750 rpm durante 5 minutos y después a 2000 rpm durante 20 minutos). Después de terminar la centrifugación, se recuperaron células mononucleares (monocitos de sangre periférica sanos) de una fracción de capa intermedia y después se lavaron con PBS tres veces. A continuación, se preparó una suspensión celular con un medio de ensayo y las células preparadas se usaron como células efectoras.

(3) Actividad de ADCC de anticuerpos anti-hTROP-2 humanizados (anticuerpos HuK5-70, HuK5-70-2 y HuT6-16-2)

Se distribuyeron 100 µl (2 x 10^4 células/pocillo) de la solución de célula diana preparada en una placa de fondo plano de 96 pocillos (fabricada por FALCON). Posteriormente, se añadieron a la placa células mononucleares de sangre periférica humana (células efectoras), para que la relación entre las células efectoras y las células diana pueda ser 40:1. A continuación, se añadió cada uno de los anticuerpos anti-hTROP-2 humanizados (anticuerpos HuK5-70, HuK5-70-2 y HuT6-16-2) como anticuerpos de ensayo a la placa a una concentración final de 0,1 a 30 µg/ml. La mezcla se ajustó a una cantidad total de 200 µl y después se cultivó en una incubadora de CO_2 (a 37 °C en CO_2 al 5 %) durante 6 horas. Después de finalizar el cultivo, la actividad de lactato deshidrogenasa liberada del citoplasma de las células diana dañadas por las células efectoras se midió usando el kit de detección de citotoxicidad (LDH) (Roche, Cat. n.º 11 644 793 001) de acuerdo con protocolos incluidos con el kit y después se evaluó la actividad de ADCC usando el resultado de la medición como indicador.

Como se muestra en las Figuras 72A a 72C, resultó evidente que los anticuerpos HuK5-70 y HuT6-16-2 muestran actividad ADCC dependiente de dosis en una línea celular de cáncer de colon humano SW480 (Figura 72A), una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59 (Figura 72B) y una línea celular de cáncer de próstata humano PC-3 (Figura 72C), cada una de las cuales expresa hTROP-2 en la superficie celular. Además, como se muestra en las Figuras 72B y 72C, resultó evidente que el anticuerpo HuK5-70-2 presenta actividad ADCC en la línea celular de cáncer de páncreas PK-59 y la línea celular de cáncer de próstata humano PC-3, en donde la actividad ADCC mencionada anteriormente es más fuerte que la del anticuerpo HuK5-70. Como se ha mencionado anteriormente, el anticuerpo HuK5-70-2 es un anticuerpo cuya capacidad de unión (avidez) a hTROP-2 se ha mejorado mediante la sustitución de R (arginina) en la posición 44 de HuK5-70 VH con G (glicina). Se demostró que la avidez del anticuerpo HuK5-70-2, que había mejorado en comparación con el anticuerpo HuK5-70, se refleja en la actividad ADCC. Por lo tanto, se supone que el anticuerpo HuK5-70-2 tiene excelente actividad antitumoral incluso *in vivo,* como con el anticuerpo HuK5-70 (en donde el anticuerpo HuK5-70-2 puede tener preferentemente actividad antitumoral mayor que la del anticuerpo HuK5-70). A partir de los resultados descritos anteriormente, se sugirió que los anticuerpos HuK5-70, HuK5-70-2 y HuT6-16-2 se convierten en anticuerpos terapéuticos útiles para el cáncer que expresa hTROP-2 en la superficie celular.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

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

TEXTO LIBRE DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 3	ADN sintético
SEQ ID NO: 4	ADN sintético
SEQ ID NO: 5	ADN sintético
SEQ ID NO: 6	ADN sintético
SEQ ID NO: 7	ADN sintético
SEQ ID NO: 8	ADN sintético
SEQ ID NO: 9	ADN sintético
SEQ ID NO: 10	ADN sintético
SEQ ID NO: 11	ADN sintético
SEQ ID NO: 12	ADN sintético
SEQ ID NO: 13	ADN sintético
SEQ ID NO: 14	ADN sintético
SEQ ID NO: 15	ADN sintético
SEQ ID NO: 16	ADN sintético
SEQ ID NO: 17	ADN sintético
SEQ ID NO: 18	ADN sintético
SEQ ID NO: 19	ADN sintético
SEQ ID NO: 20	ADN sintético
SEQ ID NO: 21	ADN sintético
SEQ ID NO: 22	ADN sintético
SEQ ID NO: 23	ADN sintético
SEQ ID NO: 24	ADN sintético
SEQ ID NO: 25	ADN sintético
SEQ ID NO: 26	ADN sintético
SEQ ID NO: 27	ADN sintético
SEQ ID NO: 28	ADN sintético
SEQ ID NO: 29	ADN sintético
SEQ ID NO: 30	ADN sintético
SEQ ID NO: 31	ADN sintético
SEQ ID NO: 32	ADN sintético
SEQ ID NO: 33	ADN sintético
SEQ ID NO: 74	ADN recombinante
SEQ ID NO: 75	Construcción sintética (proteína recombinante)
SEQ ID NO: 76	ADN recombinante
SEQ ID NO: 77	Construcción sintética (proteína recombinante)
SEQ ID NO: 78	ADN recombinante
SEQ ID NO: 79	Construcción sintética (proteína recombinante)
SEQ ID NO: 80	ADN recombinante
SEQ ID NO: 81	Construcción sintética (proteína recombinante)
SEQ ID NO: 82	ADN recombinante
SEQ ID NO: 83	Construcción sintética (proteína recombinante)
SEQ ID NO: 92	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 93	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 94	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 95	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 96	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 97	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 98	Proteína recombinante
SEQ ID NO: 99	ADN recombinante
SEQ ID NO: 100	ADN recombinante

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LivTech, Inc.

<120> anticuerpo anti-hTROP-2

<130> PCT12-0027

<150> US61/562.672
<151> 22-11-2011

<160> 234

<170> PatentIn versión 3.4

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

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

<400> 1

```
gcgggtcccc agaagcctac aggtgagtat cggttctccc cttcccggct ttcggtccgg      60

aggaggcggg agcagcttcc ctgttctgat cctatcgcgg gcggcgcagg gccggcttgg     120

ccttccgtgg gacggggagg ggggcgggat gtgtcaccca aataccagtg gggacggtcg     180

gtggtggaac cagccgggca ggtcgggtag agtataagag ccggagggag cggccgggcg     240

gcagacgcct gcagaccatc ccagacgccg gagcccgagc cccgacgagt ccccgcgcct     300

catccgcccg cgtccggtcc gcgttcctcc gccccacc atg gct cgg ggc ccc ggc     356
                                          Met Ala Arg Gly Pro Gly
                                          1               5

ctc gcg ccg cca ccg ctg cgg ctg ccg ctg ctg ctg ctg gtg ctg gcg      404
Leu Ala Pro Pro Pro Leu Arg Leu Pro Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala
            10                  15                  20

gcg gtg acc ggc cac acg gcc gcg cag gac aac tgc acg tgt ccc acc      452
Ala Val Thr Gly His Thr Ala Ala Gln Asp Asn Cys Thr Cys Pro Thr
        25                  30                  35

aac aag atg acc gtg tgc agc ccc gac ggc ccc ggc ggc cgc tgc cag      500
Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln
    40                  45                  50

tgc cgc gcg ctg ggc tcg ggc atg gcg gtc gac tgc tcc acg ctg acc      548
Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr
55                  60                  65                  70

tcc aag tgt ctg ctg ctc aag gcg cgc atg agc gcc ccc aag aac gcc      596
Ser Lys Cys Leu Leu Leu Lys Ala Arg Met Ser Ala Pro Lys Asn Ala
                75                  80                  85

cgc acg ctg gtg cgg ccg agt gag cac gcg ctc gtg gac aac gat ggc      644
Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala Leu Val Asp Asn Asp Gly
            90                  95                  100
```

```
ctc tac gac ccc gac tgc gac ccc gag ggc cgc ttc aag gcg cgc cag      692
Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
        105                 110                 115

tgc aac cag acg tcg gtg tgc tgg tgc gtg aac tcg gtg ggc gtg cgc      740
Cys Asn Gln Thr Ser Val Cys Trp Cys Val Asn Ser Val Gly Val Arg
    120                 125                 130

cgc acg gac aag ggc gac ctg agc cta cgc tgc gat gag ctg gtg cgc      788
Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg Cys Asp Glu Leu Val Arg
135                 140                 145                 150

acc cac cac atc ctc att gac ctg cgc cac cgc ccc acc gcc ggc gcc      836
Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
                155                 160                 165

ttc aac cac tca gac ctg gac gcc gag ctg agg cgg ctc ttc cgc gag      884
Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu
            170                 175                 180

cgc tat cgg ctg cac ccc aag ttc gtg gcg gcc gtg cac tac gag cag      932
Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys Phe Val Ala Ala Val His Tyr Glu Gln
        185                 190                 195

ccc acc atc cag atc gag ctg cgg cag aac acg tct cag aag gcc gcc      980
Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn Thr Ser Gln Lys Ala Ala
    200                 205                 210

ggt gac gtg gat atc ggc gat gcc gcc tac tac ttc gag agg gac atc     1028
Gly Asp Val Asp Ile Gly Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Glu Arg Asp Ile
215                 220                 225                 230

aag ggc gag tct cta ttc cag ggc cgc ggc ggc ctg gac ttg cgc gtg     1076
Lys Gly Glu Ser Leu Phe Gln Gly Arg Gly Gly Leu Asp Leu Arg Val
                235                 240                 245

cgc gga gaa ccc ctg cag gtg gag cgc acg ctc atc tat tac ctg gac     1124
Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg Thr Leu Ile Tyr Tyr Leu Asp
            250                 255                 260

gag att ccc ccg aag ttc tcc atg aag cgc ctc acc gcc ggc ctc atc     1172
Glu Ile Pro Pro Lys Phe Ser Met Lys Arg Leu Thr Ala Gly Leu Ile
        265                 270                 275

gcc gtc atc gtg gtg gtc gtg gtg gcc ctc gtc gcc ggc atg gcc gtc     1220
Ala Val Ile Val Val Val Val Val Ala Leu Val Ala Gly Met Ala Val
    280                 285                 290

ctg gtg atc acc aac cgg aga aag tcg ggg aag tac aag aag gtg gag     1268
Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser Gly Lys Tyr Lys Lys Val Glu
295                 300                 305                 310

atc aag gaa ctg ggg gag ttg aga aag gaa ccg agc ttg tag             1310
Ile Lys Glu Leu Gly Glu Leu Arg Lys Glu Pro Ser Leu
                315                 320

gtacccggcg gggcagggga tggggtgggg taccggattt cggtatcgtc ccagacccaa   1370

gtgagtcacg cttcctgatt cctcggcgca aaggagacgt ttatcctttc aaattcctgc   1430

cttccccctc ccttttgcgc acacaccagg tttaatagat cctggcctca gggtctcctt   1490
```

```
tctttctcac ttctgtcttg aaggaagcat ttctaaaatg tatccccttt cggtccaaca   1550

acaggaaacc tgactggggc agtgaaggaa gggatggcat agcgttatgt gtaaaaaaca   1610

agtatctgta tgacaacccg ggatcgtttg caagtaactg aatccattgc gacattgtga   1670

aggcttaaat gagtttagat gggaaatagc gttgttatcg ccttgggttt aaattatttg   1730

atgagttcca cttgtatcat ggcctacccg aggagaagag gagtttgtta actgggccta   1790

tgtagtagcc tcatttacca tcgtttgtat tactgaccac atatgcttgt cactgggaaa   1850

gaagcctgtt tcagctgcct gaacgcagtt tggatgtctt tgaggacaga cattgcccgg   1910

aaactcagtc tatttattct tcagcttgcc cttactgcca ctgatattgg taatgttctt   1970

ttttgtaaaa tgtttgtaca tatgttgtct ttgataatgt tgctgtaatt ttttaaaata   2030

aaacacgaat ttaataaaat atgggaaagg cacaaaccag aaaaaaaaaa              2080
```

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

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Leu
```

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

<220>
<223> ADN sintético

<400> 3
ttcctccgcc ccaccatggc 20

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

<220>

<223> ADN sintético

<400> 4
ctcgagcaag ctcggttcct ttctc 25

<210> 5
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 5
ctcgagctcg tccaggtaat agatgagcg 29

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

<220>
<223> ADN sintético

<400> 6
gatccactag tcgcgagtgg tgg 23

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

<220>
<223> ADN sintético

<400> 7
aattccacca ctcgcgacta gtg 23

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

<220>
<223> ADN sintético

<400> 8
tcctcgtgtc ccactcccgg 20

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

<220>
<223> ADN sintético

<400> 9
ctcgagtgca ttgagttccc tatgc 25

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

<220>

<223> ADN sintético

<400> 10
cctgagccta cgctgcgacg aagtggtgcg 30

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

<220>
<223> ADN sintético

<400> 11
cgcaccactt cgtcgcagcg taggctcagg 30

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

<220>
<223> ADN sintético

<400> 12
gactgctcca cgctgacttc caagtgcctg 30

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

<220>
<223> ADN sintético

<400> 13
caggcacttg gaagtcagcg tggagcagtc 30

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

<220>
<223> ADN sintético

<400> 14
ctcgtggaca acgatggcct ctacgacccg 30

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

<220>
<223> ADN sintético

<400> 15
cgggtcgtag aggccatcgt tgtccacgag 30

<210> 16
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 16
ccaaagcctg cgctgcgatg agctggtgcg c 31

<210> 17
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 17
gcgcaccagc tcatcgcagc gcaggctttg g 31

<210> 18
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 18
agcttcctat ccgcggtgca ctacgagcag 30

<210> 19
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 19
ctgctcgtag tgcaccgcgg ataggaagct 30

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

<220>
<223> ADN sintético

<400> 20
gacattaaag gcgagtctct attccagggc 30

<210> 21
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 21
gccctggaat agagactcgc ctttaatgtc 30

<210> 22
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 22
ctactccacc ccaccctggc g 21

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

<220>
<223> ADN sintético

<400> 23
ctcgagcaag ctaggttcgc ttctc 25

<210> 24
<211> 12
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 24
tccakagttcca 12

<210> 25
<211> 12
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 25
gctgtcctga tc 12

<210> 26
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 26
ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45

<210> 27
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 27
ctaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 28
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 28
gggaartarc ccttgaccag gca 23

<210> 29
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 29
gggaartagc ctttgacaag gca 23

<210> 30
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 30
cactgccatc aatvctccac ttgaca 27

<210> 31
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 31
cgactggagc acgaggacac tga 23

<210> 32
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 32
gccagtggat agacagatgg 20

<210> 33
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 33
gatggataca gttggtgcag c 21

<210> 34
<211> 402
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(402)

<400> 34

```
atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt        48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1               5                   10                  15

gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg agg        96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
            20                  25                  30

cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc       144


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

acc atc tac tgg ata aac tgg gtg aaa cag agg cct gga caa ggc ctt       192
Thr Ile Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg atc gga aat att tat cct tct gat agt tat act aac tac aat       240
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65                  70                  75                  80

caa aag ttc aag gac aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc       288
Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
                85                  90                  95

aca gcc tac atg cag ctc agc agc ccg aca tct gag gac tct gcg gtc       336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
            100                 105                 110

tat tac tgt aca aga acg tct atg gcg gac tac tgg ggc caa ggc acc       384
Tyr Tyr Cys Thr Arg Thr Ser Met Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

act ctc aca gtc tcc tca                                               402
Thr Leu Thr Val Ser Ser
    130
```

<210> 35
<211> 134
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
    130
```

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

<400> 36

```
Ile Tyr Trp Ile Asn
1               5
```

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

<400> 37

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

Asp
```

<210> 38

<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 38

```
Thr Ser Met Ala Asp Tyr
1               5
```

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

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

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 41

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

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

```
Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1               5
```

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 43

```
Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr
1               5
```

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

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(402)

<400> 44

```
atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt       48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1               5                   10                  15

gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag caa cct ggg tct gag ctg gtg agg       96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg
            20                  25                  30

cct gga gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttc      144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
        35                  40                  45

acc agc tac tgg atg cac tgg gtg aag cag agg cat gga caa ggc ctt      192
Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg His Gly Gln Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg att gga aat att tat cct ggt ggt ggt tat act aac tac gat      240

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

gag aag ttc aag agc aag ggc aca ctg act gta gac aca tcc tcc agc      288
Glu Lys Phe Lys Ser Lys Gly Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser
                85                  90                  95

aca gcc tac atg cac ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc      336
Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
            100                 105                 110

tat tac tgt aca aga tca tcc gtt ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc      384
Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Ser Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

act ctc aca gtc tcc tca                                             402
Thr Leu Thr Val Ser Ser
    130
```

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

<400> 45

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

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

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

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

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

Glu Lys Phe Lys Ser Lys Gly Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser
                85                  90                  95

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Ser Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Thr Leu Thr Val Ser Ser
    130
```

<210> 46
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 46

```
Ser Tyr Trp Met His
1               5
```

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 47

```
Asn Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe Lys
1               5                  10                  15

Ser
```

<210> 48
<211> 6

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

```
Ser Ser Val Phe Asp Tyr
1               5
```

<210> 49
<211> 381
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

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

<400> 49

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

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

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

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


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

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

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

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

<210> 50
<211> 127
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 50

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 51

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

<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 52

```
Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1               5
```

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 53

```
Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr
1               5
```

<210> 54
<211> 396
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

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

<400> 54

```
atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt      48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1               5                   10                  15

gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg agg      96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
            20                  25                  30

cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc     144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
        35                  40                  45

acc agc tac tgg ata acc tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt     192
Thr Ser Tyr Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg atc gga aat att tat cct tct gat agt tat act aac tac aat     240
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65                  70                  75                  80

caa aag ttc agg gac aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agt     288
Gln Lys Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
                85                  90                  95

aca gcc tac atg cag ctc agc agc ccg aca tct gag gac tct gcg gtc     336


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

tat tac tgt tca gcc ctc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc     384
Tyr Tyr Cys Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
        115                 120                 125

aca gtc tcc tca                                                    396
Thr Val Ser Ser
    130
```

<210> 55
<211> 132
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 55

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
    130
```

<210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 56

```
Ser Tyr Trp Ile Thr
1               5
```

<210> 57
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 57

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

Asp
```

<210> 58
<211> 4
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 58

```
Leu Phe Asp Tyr
1
```

<210> 59
<211> 381
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

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

<400> 59

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 61

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

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 62

```
Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1               5
```

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

<400> 63

```
Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr
1               5
```

<210> 64
<211> 423
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

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

<400> 64

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

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

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

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

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

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

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

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

gac tat tgg ggt caa gga acc tca gtc atc gtc tcc tca                   423

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

<210> 65
<211> 141
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 66

```
Asp Tyr Asn Met His
1               5
```

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 67

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

Ser
```

<210> 68
<211> 13

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 68

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

<210> 69
<211> 390
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(390)

<400> 69

```
atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct       48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1               5                   10                  15

tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc       96
Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
            20                  25                  30

agt ctt gga gat cag gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt      144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
        35                  40                  45

gta cac ggt aat gga aac acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca      192
Val His Gly Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
    50                  55                  60

ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct      240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg acg gat ttc aca      288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc      336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

tct caa act aca cat gtt ccc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa      384
Ser Gln Thr Thr His Val Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
        115                 120                 125

ata aaa                                                             390
Ile Lys
    130
```

<210> 70
<211> 130
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 70

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

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
            20                  25                  30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
        35                  40                  45

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

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
        115                 120                 125

Ile Lys
    130
```

<210> 71
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 71

```
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Gly Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1               5                  10                  15
```

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 72

```
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1               5
```

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

<400> 73

```
Ser Gln Thr Thr His Val Pro Thr
1               5
```

<210> 74
<211> 402
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN recombinante

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(402)

<400> 74

```
atg ggg tgg agc tgc att atc ctg ttt ctt gtc gca act gca aca ggc       48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1               5                   10                  15

gtt cac tca cag gtt cag cta gtc cag tct gga gct gag gtg aag aaa       96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
            20                  25                  30

cca ggg gca tct gtc aaa gtg agc tgt aag gcc tct ggc tat acg ttc      144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
        35                  40                  45

acg ata tac tgg atc aat tgg gtg agg caa gct cct gga caa cgg ttg      192
Thr Ile Tyr Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
    50                  55                  60

gaa tgg att ggc aac atc tat ccc tca gac tcc tac acc aac tac aat      240
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65                  70                  75                  80

cag aag ttc aag gac aaa gcc act ctc acc gta gat acc agt gcc tcc      288
Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser
                85                  90                  95

aca gcc tat atg gag ctg agc agt tta cgc agc gaa gat aca gcg gtg      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

tac tac tgc acc aga acc tcc atg gct gac tat tgg ggt cag ggt aca      384
Tyr Tyr Cys Thr Arg Thr Ser Met Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

        115                 120                 125

ctg gtg act gtg agc tcc                                             402
Leu Val Thr Val Ser Ser
    130
```

<210> 75
<211> 134
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 75

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu 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 Ile Tyr Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
    50                  55                  60

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
    130
```

<210> 76
<211> 381
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN recombinante

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

<400> 76

```
atg gta agc aca ccc cag ttc ctc gtt ttc ctc ctg ttt tgg att ccc       48
Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro
1               5                   10                  15

gca agt aga ggg gag atc gtc ttg act cag agt cct gcc aca ctg tct       96
Ala Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
            20                  25                  30

ctt tca cca gga gaa agg gcg aca ctt agc tgt cga gct tct cag agc      144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

att ggc acg tcc ata cac tgg tat cag cag aaa ccg gga caa gct cca      192
Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
    50                  55                  60

cgg tta ctg atc aag tat gcc tcc gaa agc atc tct ggg att cct gca      240
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala
65                  70                  75                  80

cgc ttt agc gga agc ggt agt ggt acc gac ttc act ctg acc ata tcc      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

tca cta gaa ccc gag gat ttt gcc gtg tac tac tgc cag cag tcc aac      336
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
            100                 105                 110

tca tgg cct ttc acc ttt ggc caa ggc acc aaa gtg gag atc aag          381
Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
        115                 120                 125
```

<210> 77
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 77

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

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

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

Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
    50                  55                  60
```

```
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala
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 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
            100                 105                 110

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

<210> 78
<211> 423
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN recombinante

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

<400> 78

```
atg gga tgg tct tgg atc ttt ctc ttc ctg ctg tct ggc aca gct gga       48
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1               5                   10                  15

gtg cat tcc caa gtt cag ctg gtc cag tcc gga gct gaa gtt aaa aag       96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
            20                  25                  30

ccc ggg gcc agc gtc aaa gtc tcc tgc aag gca tcc ggg tat act ttt      144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
        35                  40                  45

acc gat tat aac atg cac tgg gtg cgc caa gca ccc ggc cag ggc ctg      192
Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg att ggc tat atc tat cct tat aat gga ggg acc ggc tac aac      240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
65                  70                  75                  80

cag aga ttc aag agc aga gcc acc atg aca gtg gat aaa tct acc agc      288
Gln Arg Phe Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
                85                  90                  95

act gcc tac atg gag ctg aga agc ctg cgg agc gac gac aca gcc gtg      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

tac tac tgt gcc cgc gag gat tac gga agc agc cca agc tac gcc atg      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Ala Met
        115                 120                 125

gat tac tgg ggc caa ggc act atg gtg acc gtg agc agc                  423

            Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
                130                 135                 140
```

<210> 79
<211> 141
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 79

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

Val His 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 Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
    50                  55                  60

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

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

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

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

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140
```

<210> 80
<211> 423
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN recombinante

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

<400> 80

```
atg ggc tgg tct tgg atc ttc ctc ttc ctg ctg agc ggg acc gct gga       48
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1               5                   10                  15

gtc cat tct caa gtc caa ctg gtc cag tcc ggg gct gaa gtg aaa aaa       96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
            20                  25                  30

cca gga gca tcc gtt aag gtg tcc tgt aag gca agc gga tac acc ttt      144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
        35                  40                  45

acc gac tat aac atg cac tgg gtg agg cag gcc ccc gga cag ggg ctg      192
Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg atc ggc tat att tat cct tac aac ggg ggc act ggc tat aat      240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
65                  70                  75                  80

cag aga ttt aag agc cgc gct acc atg acc gtg gac acc tcc act tct      288
Gln Arg Phe Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
                85                  90                  95

aca gcc tat atg gag ctg aga agc ctg cgg agc gat gat aca gcc gtg      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

tac tac tgc gcc aga gaa gat tac ggc agc agc ccc agc tac gcc atg      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Ala Met
        115                 120                 125

gac tac tgg ggc cag ggc aca atg gtt act gtg agc agc                  423
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140
```

<210> 81
<211> 141
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 81

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

Val His 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 Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
    50                  55                  60
```

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

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

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

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

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140
```

<210> 82
<211> 390
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN recombinante

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(390)

<400> 82

```
atg aag ctc cca gtg cgc ctc ctg gtc ctg atg ttc tgg att ccc gct  48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1               5                   10                  15

tcc tct agc gat atc gtc atg acc caa tcc cca ctg tct ctg cct gtg  96
Ser Ser Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
            20                  25                  30

aca cca ggc gaa cct gca tct att agc tgt aga agc agc cag tcc ctg  144
Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
        35                  40                  45

gtg cac gga aac gga aac acc tat ctg cac tgg tac ctg caa aaa cct  192
Val His Gly Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
    50                  55                  60

gga cag agc ccc cag ctg ctg atc tac aaa gtc agc aat aga ttt agc  240
Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80

ggg gtg ccc gac agg ttt agc ggc agc ggc agc ggc aca gat ttc acc  288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctg aaa atc tcc cgg gtg gaa gcc gag gac gtt ggg gtt tac tat tgc  336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110
```

```
agc cag aca acc cat gtg ccc act ttc ggg ggc ggc act aag gtg gag      384
Ser Gln Thr Thr His Val Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
        115                 120                 125

atc aag                                                              390
Ile Lys
    130
```

<210> 83
<211> 130
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 83

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

Ser Ser Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
            20                  25                  30

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

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

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

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

Ile Lys
    130
```

<210> 84
<211> 563
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (102)..(458)

<400> 84

```
aaccacatcc ctcctcagaa gcccccagag cacaactcct taccatggac tggacctgga      60

ggatcctctt tttggtggca gcagccacag gtgcccactc c cag gtc cag ctt gtg     116
                                              Gln Val Gln Leu Val
                                              1               5

cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc      164
Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser
                10                  15                  20

tgc aag gct tct gga tac acc ttc act aac tat gct ctg cat tgg gtg      212
Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Ala Leu His Trp Val
            25                  30                  35

cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg atg gga tgg atc aac act      260
Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr
        40                  45                  50

ggc aat ggt aac aca aaa tat tca cag aag ttc cag ggc aga gtc acc      308
Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr
    55                  60                  65

ctt acc agt gac aca tcc gcg agc aca gcc tac atg gag atg agc agc      356
Leu Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Met Ser Ser
70                  75                  80                  85

ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac tgt gcg agg agc agt ggc      404
Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ser Gly
                90                  95                  100

tgg tac gtt tgg ttc gac ccc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc      452
Trp Tyr Val Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
            105                 110                 115

tcc tca gcttccacca agggcccatc ggttttcccc ctggcgccct gctccaggag       508
Ser Ser

cacctctggg ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaa         563
```

<210> 85
<211> 119
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 85

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

Met Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 86
<211> 384
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(384)

<400> 86

```
atg gaa gtc ctc gtg cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca       48
Met Glu Val Leu Val Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1               5                   10                  15

gat acc acc gga gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct       96
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
            20                  25                  30

ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt      144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

gtt agc agc tac tta gcc tgg tat caa cag aaa cct ggc cag gct ccc      192
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
    50                  55                  60

agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc      240
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65                  70                  75                  80

agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc      336
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
            100                 105                 110

aac tgg cct cgg tcg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cga      384
Asn Trp Pro Arg Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
        115                 120                 125
```

<210> 87
<211> 128
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 87

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

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

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

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
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 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
            100                 105                 110

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

<210> 88
<211> 601
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (112)..(477)

<400> 88

```
acccaaaaac cacacccctc cttgggagaa tcccctagat cacagctcct caccatggac     60

tggacctgga gcatcctttt cttggtggca gcagcaacag gtgcccactc c cag gtt     117
                                                          Gln Val
                                                          1

cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc tca gtg      165
Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
        5                  10                  15

aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt acc agt tat ggt atc      213
Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile
```

```
    20                  25                  30

agt tgg gtg cgc cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg gga ttg      261
Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Leu
35                  40                  45                  50

atc agc gct tac aat ggt aac aca aac tat gca cag aag ctc cag ggc      309
Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly
                55                  60                  65

aga gtc acc atg acc gta gac acg tct acg agc aca gcc tat atg gaa      357
Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
            70                  75                  80

ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtc tat tac tgt gcg aga      405
Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
        85                  90                  95

gat gga ata gca gtg gcg acc aaa gat gct ttt gat atc tgg ggc caa      453
Asp Gly Ile Ala Val Ala Thr Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
    100                 105                 110

ggg aca atg gtc acc gtc tct tca gcacccacca aggctccgga tgtgttcccc     507
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115                 120

atcatatcag ggtgcagaca cccaaaggat aacagccctg tggtcctggc atgcttgata    567

actgggtacc acccaacgtc cgtgactgtc acct                               601
```

<210> 89
<211> 122
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 89

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

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

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

Gly Leu Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
    50                  55                  60

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

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Gly Ile Ala Val Ala Thr Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp

                100                 105                 110

        Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
            115                 120
```

<210> 90
<211> 342
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(342)

<400> 90

```
gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga       48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1               5                  10                  15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg cat agt       96
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct      144
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

cca cag ctc ctg atc tat ttg ggt tct aat cgg gcc tcc ggg gtc cct      192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc      240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

agc agg gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa gct      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
                85                  90                  95

cta caa act ctg ggg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc      336
Leu Gln Thr Leu Gly Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
            100                 105                 110

aaa cga                                                             342
Lys Arg
```

<210> 91
<211> 114
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 91

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
```

20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Leu Gly Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 92
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína recombinante

<400> 92

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

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

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

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

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Arg Thr Ser Met Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            100                 105                 110

                        Val Ser Ser
                            115
```

<210> 93
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína recombinante

<400> 93

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
            20                  25                  30

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

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

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

<210> 94
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína recombinante

<400> 94

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
```

```
          35                  40                  45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Arg Phe
    50                  55                  60

Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 95
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína recombinante

<400> 95

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Arg Phe
    50                  55                  60

Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 96
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína recombinante

<400> 96

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

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

Thr His Val Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 97
<211> 134
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 97

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu 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 Ile Tyr Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
```

```
     50                  55                  60

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
    130
```

<210> 98
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína recombinante

<400> 98

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

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

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

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

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Arg Thr Ser Met Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            100                 105                 110

Val Ser Ser
        115
```

<210> 99
<211> 420
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN recombinante

<220>
<221> CDS
<222> (13)..(414)

<400> 99

```
gaattcacca cc atg gga tgg tcc tgc att att ctc ttt ctc gtc gcc acc       51
              Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr
              1               5                   10

gcc aca ggc gtg cac agc cag gtt caa ctg cag caa cct ggg gca gag         99
Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu
    15                  20                  25

ctg gtt cgg cca ggg gcc tcc gtc aaa ctg tcc tgc aaa gct tct ggc        147
Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly
30                  35                  40                  45

tac act ttc acc atc tac tgg atc aac tgg gtg aag cag agg ccc ggc        195
Tyr Thr Phe Thr Ile Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
                50                  55                  60

cag ggc ctg gaa tgg atc gga aat atc tat cct agc gat tct tac aca        243
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr
            65                  70                  75

aat tac aac cag aag ttc aag gac aag gct acc ctg acc gtg gac aaa        291
Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys
        80                  85                  90

tct agc tcc aca gcc tac atg cag ctg agc agc ccc act agc gag gat        339
Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp
    95                  100                 105

agc gca gtg tat tat tgt acc aga acc agc atg gcc gac tat tgg gga        387
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Thr Ser Met Ala Asp Tyr Trp Gly
110                 115                 120                 125

cag ggc aca act ctg acc gtg agc agc gctagc                            420
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
                130
```

<210> 100
<211> 399
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN recombinante

<220>
<221> CDS
<222> (13)..(393)

<400> 100

```
accggtacca cc atg gtt agc aca cct caa ttt ctg gtc ttc ctg ctc ttc       51
              Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe
              1               5                   10

tgg att cct gcc agc aga gga gat atc ctc ctg aca caa agc ccc gca        99
Trp Ile Pro Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala
    15                  20                  25

atc ctg agc gtg tcc ccc gga gag cgc gtg agc ttt agc tgc cgg gcc       147
Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala
30                  35                  40                  45

agc cag agc att gga acc agc atc cac tgg tat cag cag aga acc aac       195
Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn
                50                  55                  60

ggg tct ccc agg ctg ctg att aaa tac gct tct gag tct att tcc ggg       243
Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly
            65                  70                  75

atc cca agc aga ttc tcc ggc tct ggc agc ggc act gat ttt act ctg       291
Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
        80                  85                  90

tct atc aac agc gtg gag tcc gaa gac atc gcc gac tac tat tgt cag       339
Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln
    95                  100                 105

cag agc aat tcc tgg cca ttc acc ttt ggc agc ggc acc aag ctg gaa       387
Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
110                 115                 120                 125

atc aag cgtacg                                                       399
Ile Lys
```

<210> 101
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 101

```
Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln
1               5                   10                  15

Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr
            20                  25                  30
```

<210> 102
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 102

Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala
1 5 10 15

Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser
20 25 30

<210> 103
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 103

Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys
1 5 10 15

Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser
20 25 30

<210> 104
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 104

Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr
20 25 30

<210> 105
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 105

Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys
1 5 10 15

Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu
20 25 30

<210> 106
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 106

Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg
1 5 10 15

Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys
20 25 30

<210> 107
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 107

Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu
1 5 10 15

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

<210> 108
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 108

Cys Ala Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg
1 5 10 15

Cys Ala Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg
20 25 30

Cys

<210> 109
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 109

Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly
1 5 10 15

Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp
20 25 30

<210> 110
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 110

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
20 25 30

Cys

<210> 111
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 111

His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
1 5 10 15

His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
20 25 30

<210> 112
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 112

Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys Phe Val Ala Ala
1 5 10 15

Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln
20 25 30

<210> 113
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 113

Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln
1 5 10 15

<210> 114
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 114

Cys Ala Gly Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala

20 25 30

Cys

<210> 115
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 115

Cys Pro Lys Phe Val Ala Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln
1 5 10 15

Cys Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 116
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 116

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
1 5 10 15

Cys Gly Leu Asp Leu Arg Val
20

<210> 117
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 117

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

<210> 118
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 118

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
20 25 30

Cys

<210> 119
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 119

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
1 5 10 15

Cys Arg Gly Glu Pro Leu Gln
20

<210> 120
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 120

Cys Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn Thr Ser Gln Lys Ala Ala
1 5 10 15

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
20 25 30

Cys

<210> 121
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 121

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 122
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 122

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 123
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 123

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
20 25 30

Cys

<210> 124
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 124

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Cys Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 125
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 125

Cys Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His

1 5 10 15

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
20 25 30

Cys

<210> 126
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 126

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys

<210> 127
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 127

Cys Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe
1 5 10 15

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
20 25 30

Cys

<210> 128
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 128

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 129
<211> 33
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 129

```
Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
1               5                   10                  15

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 130
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 130

```
Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn Cys
1               5                   10                  15

Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg Cys
            20                  25                  30
```

<210> 131
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 131

```
Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
1               5                   10                  15

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 132
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 132

```
Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Cys
1               5                   10                  15

Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Cys
            20                  25                  30
```

<210> 133

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

<400> 133

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
1 5 10 15

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
20 25 30

Cys

<210> 134
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 134

Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys
1 5 10 15

Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser
20 25 30

<210> 135
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 135

Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln
1 5 10 15

Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr
20 25 30

<210> 136
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 136

Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys

1 5 10 15

Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu
20 25 30

<210> 137
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 137

```
Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg
1               5                   10                  15

Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr
            20                  25                  30
```

<210> 138
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 138

```
Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp
            20                  25                  30
```

<210> 139
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 139

```
Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala
1               5                   10                  15

Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser
            20                  25                  30
```

<210> 140
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 140

```
Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly
1               5                   10                  15

    Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val
                20                  25                  30
```

<210> 141
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 141

```
Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg
1               5                   10                  15

Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys
            20                  25                  30
```

<210> 142
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 142

```
Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu
1               5                   10                  15

Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys
            20                  25                  30
```

<210> 143
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 143

```
Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly
1               5                   10                  15

Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys Cys
            20                  25                  30
```

<210> 144
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 144

```
Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro
1               5                   10                  15

Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala
            20                  25                  30
```

<210> 145
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 145

```
Asn Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly
1               5                   10                  15

Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met
            20                  25                  30
```

<210> 146
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 146

```
Asp Asn Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp
1               5                   10                  15

Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly
            20                  25                  30
```

<210> 147
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 147

```
Cys Thr Val Ala Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Ala Gln Ala Arg
1               5                   10                  15

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

Cys
```

<210> 148
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 148

```
Gln Asp Asn Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro
1               5                   10                  15

Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser
            20                  25                  30
```

<210> 149
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 149

```
Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser
1               5                   10                  15

Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys Cys Leu
            20                  25                  30
```

<210> 150
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 150

```
Cys Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg
1               5                   10                  15

Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Ala Ser Thr
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 151
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 151

```
  Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg
  1               5                   10                  15
```

<210> 152
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 152

```
Cys Ala Pro Lys Asn Ala Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala
1               5                   10                  15

Cys Ala Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala Leu Val Asp Asn
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 153
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 153

```
His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
1               5                   10                  15

His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
            20                  25                  30
```

<210> 154
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 154

```
Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala
1               5                   10                  15

Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser
            20                  25                  30
```

<210> 155
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 155

```
Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln
1               5                   10                  15

Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr
            20                  25                  30
```

<210> 156
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 156

```
Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys
1               5                   10                  15

Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser
            20                  25                  30
```

<210> 157
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 157

```
Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg
1               5                   10                  15

Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr
            20                  25                  30
```

<210> 158
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 158

```
Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys
1               5                   10                  15

Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu
            20                  25                  30
```

<210> 159
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 159

```
Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp
            20                  25                  30
```

<210> 160
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 160

```
Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg
1               5                   10                  15

Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys
            20                  25                  30
```

<210> 161
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 161

Cys Ala Gly Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 162
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 162

Cys Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly
1 5 10 15

Cys

<210> 163
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 163

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 164
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 164

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 165

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

<400> 165

```
His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
1               5                   10                  15

His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
            20                  25                  30
```

<210> 166
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 166

```
Cys Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His
1               5                   10                  15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 167
<211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 167

```
Cys Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His
1               5                   10                  15

Cys Pro Lys
```

<210> 168
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 168

```
Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu

  1               5                   10                  15

Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys
            20                  25                  30
```

<210> 169
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 169

```
Asp Leu Ser Leu Arg Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu
1               5                   10                  15

Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala Phe Asn His
            20                  25                  30
```

<210> 170
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 170

```
Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
1               5                   10                  15

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 171
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 171

```
Cys Phe Gln Gly Arg Gly Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro
1               5                   10                  15

Cys
```

<210> 172
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 172

```
Cys Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His
1               5                   10                  15

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 173
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 173

```
Cys Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg
1               5                   10                  15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 174
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 174

```
Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
1               5                   10                  15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 175
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 175

```
Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
1               5                   10                  15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 176
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 176

```
Cys Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His
1               5                  10                  15

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 177
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 177

```
Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1               5                  10                  15

Cys Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg Thr Leu Ile Tyr Tyr Leu
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 178
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 178

```
 Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu
 1               5                  10                  15
```

<210> 179
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 179

```
Cys Thr Val Ala Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Ala Gln Ala Arg

1               5                  10                  15

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 180
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 180

```
Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1               5                   10                  15

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 181
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 181

```
Leu Ser Leu Arg Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile
1               5                   10                  15

Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala Phe Asn His Ser
            20                  25                  30
```

<210> 182
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 182

```
Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
1               5                   10                  15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 183
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 183

```
Cys Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
1               5                   10                  15

Cys Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 184
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 184

```
Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Cys Asn
1               5                   10                  15
```

<210> 185
<211> 31
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 185

```
Cys Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Cys Pro
1               5                   10                  15

Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Cys
            20                  25                  30
```

<210> 186
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 186

```
Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
1               5                   10                  15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 187
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 187

```
Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala
1               5                   10                  15
```

<210> 188
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 188

Cys Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
1 5 10 15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
20 25 30

Cys

<210> 189
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 189

Cys Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr
1 5 10 15

Cys Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
20 25 30

Cys

<210> 190
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 190

Asp Cys Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Cys Asn Gln
1 5 10 15

<210> 191
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 191

Cys Thr Val Ala Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Ala Gln Ala Arg
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 192
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 192

```
Cys Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln
1               5                   10                  15

Cys Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 193
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 193

```
Cys Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr Ser Val Ala Trp
1               5                   10                  15

Cys Ala Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala Leu Val Asp Asn
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 194
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 194

```
Cys Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr
1               5                   10                  15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 195
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 195

```
Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
1               5                   10                  15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 196
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 196

```
Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu
1               5                   10                  15
```

<210> 197
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 197

```
Cys Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr Ser Val Ala
1               5                   10                  15

Cys Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr Ser Val Ala
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 198
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 198

```
Cys Thr Val Ala Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Ala Gln Ala Arg
1               5                   10                  15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 199
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 199

Cys Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala
1 5 10 15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
20 25 30

Cys

<210> 200
<211> 31
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 200

Asp Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Cys Asn
1 5 10 15

Cys Gln Thr Ser Val Cys Trp Cys Val Asn Ser Val Gly Val Arg
20 25 30

<210> 201
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 201

Cys Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr Ser Val
1 5 10 15

Cys Asp Glu Leu Val Arg His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Cys

20 25 30

<210> 202
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 202

Cys Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Ala Gln Ala Arg Ala Leu Gly Ser
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 203
<211> 33

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 203

```
Cys Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala Leu Val Asp Asn Asp Gly
1               5                   10                  15

Cys Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr Ser Val Ala Trp
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 204
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 204

```
Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
1               5                   10                  15

Cys Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 205
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 205

```
Cys Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala
1               5                   10                  15

Cys Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr Ser Val
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 206
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 206

```
Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
1               5                   10                  15
```

<210> 207

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

<400> 207

```
Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
1               5                   10                  15

Cys Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 208
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 208

```
  Cys Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Cys Asn Gln Thr
  1               5                   10                  15
```

<210> 209
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 209

```
Cys Val Asn Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser
1               5                   10                  15

Cys Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
            20                  25                  30

Cys
```

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

<400> 210

```
Cys Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg
1               5                   10                  15

Cys Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 211

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

<400> 211

```
His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
1               5                   10                  15

His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
            20                  25                  30
```

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

<400> 212

```
Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
1               5                   10                  15

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 213
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 213

```
Cys Val Asn Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser
1               5                   10                  15

Leu Arg Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile
            20                  25                  30
```

<210> 214
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 214

```
Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg Cys Asp Glu Leu
1               5                   10                  15

Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro
            20                  25                  30
```

<210> 215
<211> 33

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 215

```
Cys Val Glu Arg Thr Leu Ile Tyr Tyr Leu Asp Glu Ile Pro Pro Lys
1               5                   10                  15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 216
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 216

```
Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1               5                   10                  15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 217
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 217

```
Cys Val Asn Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser
1               5                   10                  15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 218
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 218

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 219
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 219

Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg Cys Asp
1 5 10 15

Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
20 25 30

<210> 220
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 220

Cys Ala Gly Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 221
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 221

Cys Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg
1 5 10 15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
20 25 30

Cys

<210> 222

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

<400> 222

Cys Val Arg Pro Ser Glu His Ala Leu Val Asp Asn Asp Gly Leu Tyr
1 5 10 15

Cys Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg
20 25 30

Cys

<210> 223
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 223

Cys Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His

1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 224
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 224

Cys Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg
1 5 10 15

Cys Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe
20 25 30

Cys

<210> 225
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 225

Cys Val Asn Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser
1 5 10 15

Cys Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala
20 25 30

Cys

<210> 226
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 226

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 227
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 227

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 228
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 228

Cys Ala Gly Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg
1 5 10 15

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
20 25 30

Cys

<210> 229
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 229

Cys Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His
1 5 10 15

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
20 25 30

Cys

<210> 230
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 230

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
20 25 30

Cys

<210> 231
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 231

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
20 25 30

Cys

<210> 232
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 232

```
Cys Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg Ala Asp
1               5                   10                  15

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

Cys
```

<210> 233
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 233

```
Cys Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg
1               5                   10                  15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
            20                  25                  30

Cys
```

<210> 234
<211> 33
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 234

```
Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
1               5                   10                  15

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
            20                  25                  30

Cys
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo contra TROP-2 humano en el que una región V de cadena H del anticuerpo consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 92 o 98 y una región V de cadena L del anticuerpo consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 93.

2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de cadena H del anticuerpo se muestran en las SEQ ID NO: 36 a 38, respectivamente, y/o las secuencias de aminoácidos de CDR 1 a 3 de la región V de cadena L del anticuerpo se muestran en las SEQ ID NO: 41 a 43, respectivamente.

3. El anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en donde:

(a) el anticuerpo es un anticuerpo humanizado;
(b) el anticuerpo tiene actividad antitumoral *in vivo.*
(c) el anticuerpo presenta (i) 50 % o más de actividad inhibidora del crecimiento tumoral a una dosis de 5 a 20 mg/kg de peso corporal, (ii) 50 % o más de actividad inhibidora del crecimiento tumoral a una dosis de 5 a 20 mg/kg de peso corporal en donde la frecuencia de administración para presentar la actividad inhibidora del crecimiento tumoral es como máximo una vez a la semana o (iii) 50 % o más de la actividad inhibidora del crecimiento tumoral por una única administración del anticuerpo a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal;
(d) el anticuerpo tiene actividad antitumoral en dos o más tipos de líneas celulares tumorales humanas;
(e) la constante de disociación (valor Kd) es $1{,}0 \times 10^{-10}$ M o menos; y/o
(f) el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

4. El anticuerpo según la reivindicación 3, en donde las líneas celulares tumorales son:

(a) al menos dos tipos seleccionados del grupo que consiste en una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59, una línea celular de cáncer de páncreas humano BxPC-3, una línea celular de cáncer de páncreas humano KP-3L, una línea celular de cáncer de páncreas humano KP-2, una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-1, una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-45H, una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-45P, una línea celular de cáncer de páncreas humano TCC-PAN2, una línea celular de cáncer de páncreas humano SUIT-2, una línea celular de cáncer de colon humano CACO-2, una línea celular de cáncer de colon humano SW480, una línea celular de cáncer de colon humano DLD-1, una línea celular de cáncer de colon humano HCT 116, una línea celular de cáncer de mama humano JIMT-1, una línea celular de cáncer de mama humano HCC1143, una línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, una línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468, una línea celular de cáncer de próstata humano DU145, una línea celular de cáncer de próstata humano PC-3, una línea celular de cáncer de ovario humano SK-OV-3, una línea celular de cáncer de pulmón humano Calu-3 y una línea celular de cáncer de conducto biliar humano TFK-1; o
(b) al menos dos tipos seleccionados del grupo que consiste en una línea celular de cáncer de páncreas humano PK-59, una línea celular de cáncer de páncreas humano BxPC-3, una línea celular de cáncer de colon humano SW480, una línea celular de cáncer de pulmón humano Calu-3, una línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 y una línea celular de cáncer de ovario humano SK-OV-3.

5. Un fragmento de anticuerpo procedente del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 92 o 98 y la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 93.

6. Un conjugado de anticuerpo-fármaco, que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el fragmento de anticuerpo según la reivindicación 5 y una sustancia que tiene actividad antitumoral y/o actividad destructora de células.

7. Una composición farmacéutica, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el fragmento de anticuerpo según la reivindicación 5 y el conjugado según la reivindicación 6.

8. La composición según la reivindicación 7, para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de tumor llevado a cabo en el cuerpo humano o animal.

9. Un agente terapéutico tumoral, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el fragmento de anticuerpo según la reivindicación 5 y el conjugado según la reivindicación 6.

10. La composición para su uso según la reivindicación 8 o el agente terapéutico según la reivindicación 9, que no provoca reducción del peso como efecto secundario de la terapia.

11. Un agente de diagnóstico tumoral, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el fragmento de anticuerpo según la reivindicación 5 y

el conjugado según la reivindicación 6.

12. Un método para detectar un tumor, que comprende: permitir que al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el fragmento de anticuerpo según la reivindicación 5 y el conjugado según la reivindicación 6, reaccione con una muestra recogida de un cuerpo vivo; y después detectar una señal o señales del anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo que ha reaccionado.

13. Un kit para tratar, diagnosticar o detectar un tumor, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el fragmento de anticuerpo según la reivindicación 5 y el conjugado según la reivindicación 6.

14. El anticuerpo según la reivindicación 3 o 4, el conjugado según la reivindicación 6, la composición para su uso según la reivindicación 8 o 10, el agente terapéutico según la reivindicación 9 o 10, el agente de diagnóstico según la reivindicación 11, el método según la reivindicación 12 o el kit según la reivindicación 13, en donde el tumor es al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en:

(a) cáncer de páncreas humano, cáncer de próstata humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de mama humano, cáncer de ovario humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de conducto biliar humano; o
(b) cáncer de páncreas humano, cáncer colorrectal humano, cáncer de pulmón humano, cáncer de mama humano y cáncer de ovario humano.

15. El anticuerpo, conjugado, composición, agente terapéutico, agente de diagnóstico, método o kit según la reivindicación 14, en donde el tumor es un cáncer recidivante o un cáncer metastásico.

16. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el fragmento de anticuerpo según la reivindicación 5.

17. Un vector recombinante que comprende el polinucleótido según la reivindicación 16.

18. Un transformante que comprende el vector recombinante según la reivindicación 17.

Fig.1

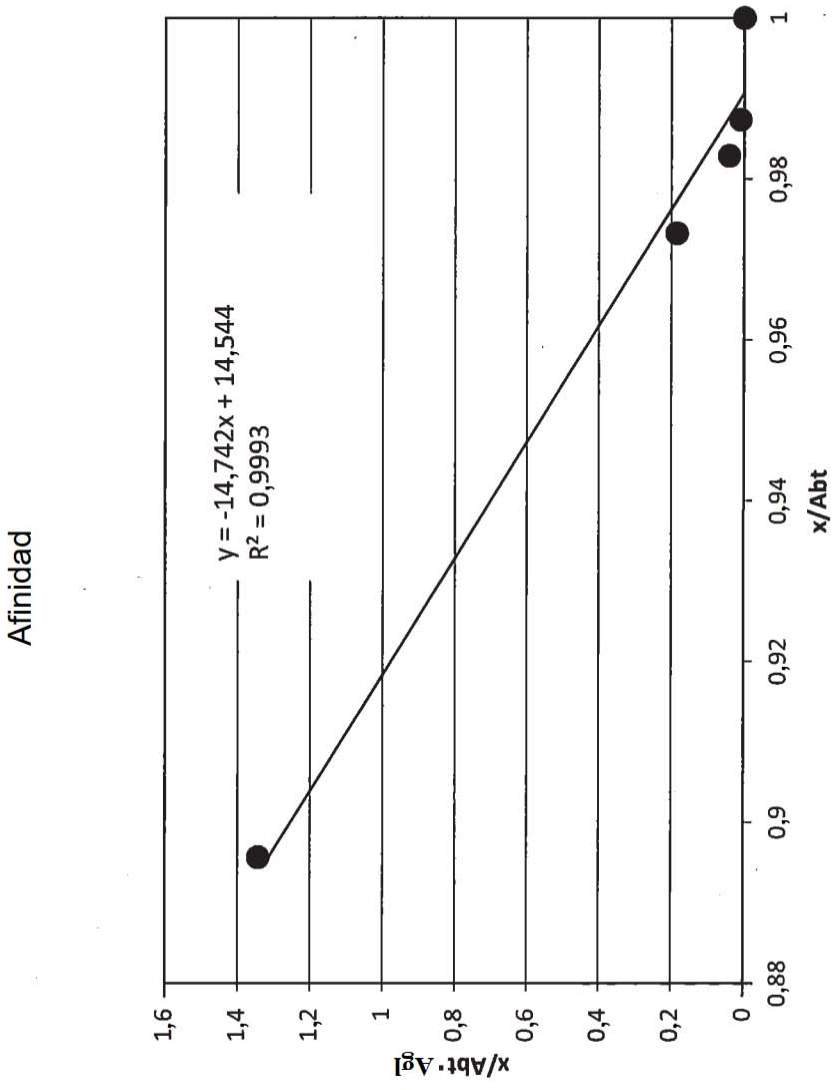

Afinidad
y = -14,742x + 14,544
R² = 0,9993
x/Abt·Ag
x/Abt
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,88
0,9
0,92
0,94
0,96
0,98
1

Fig. 2

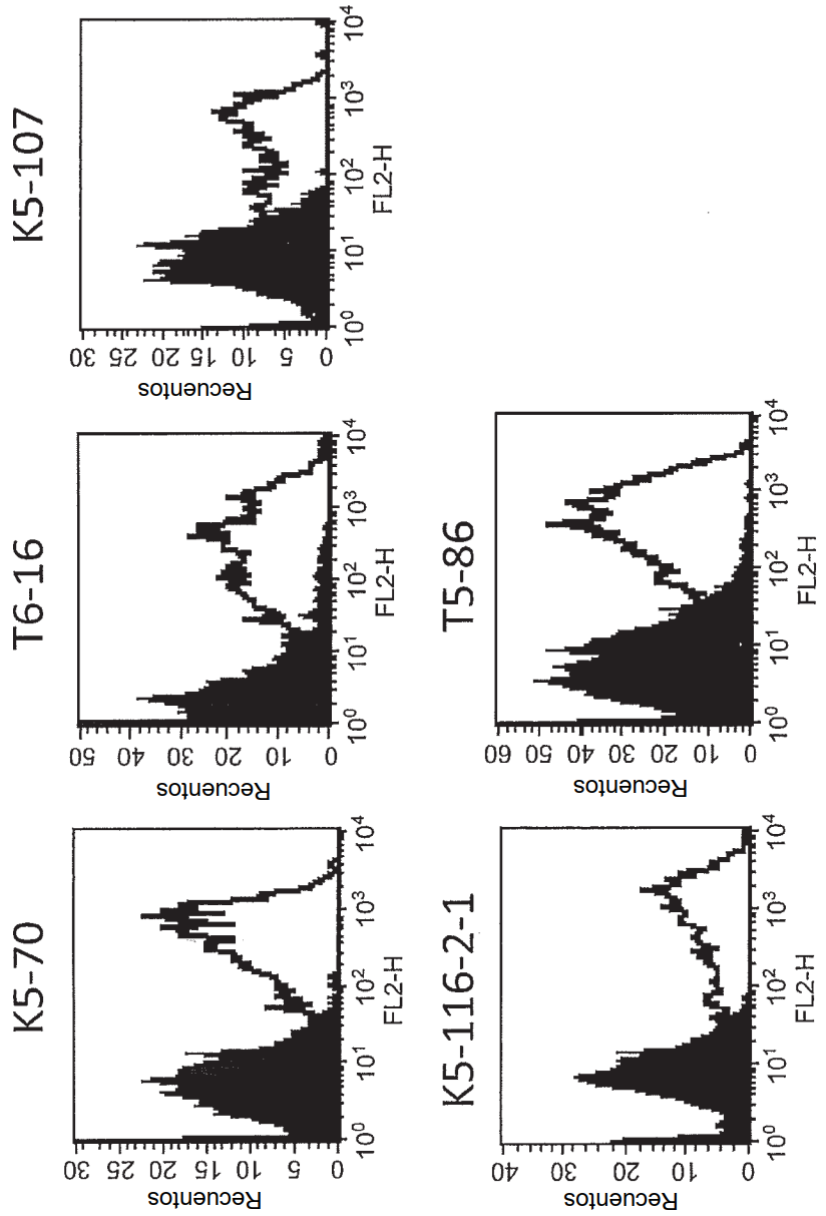


Fig. 3

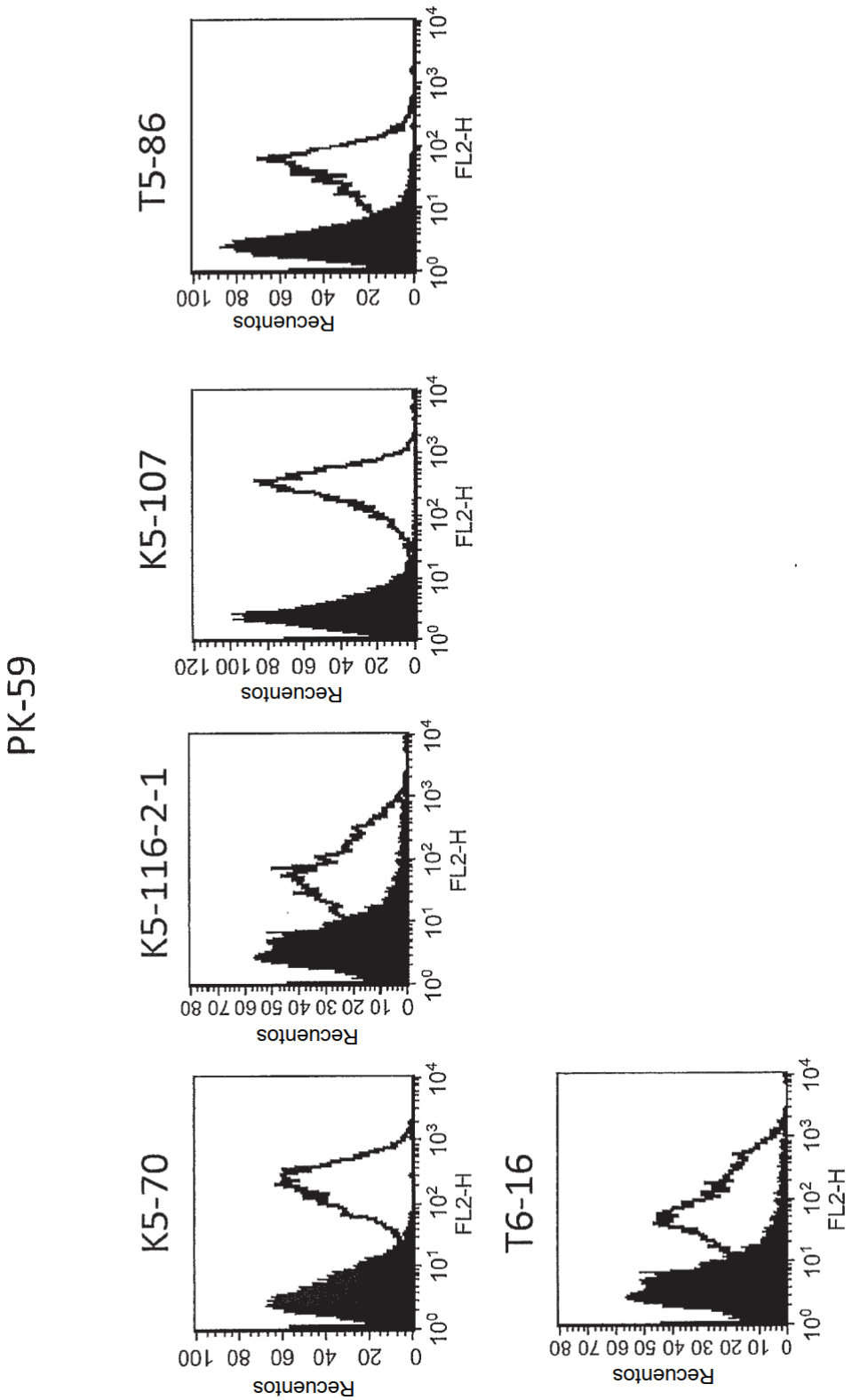


Fig. 4

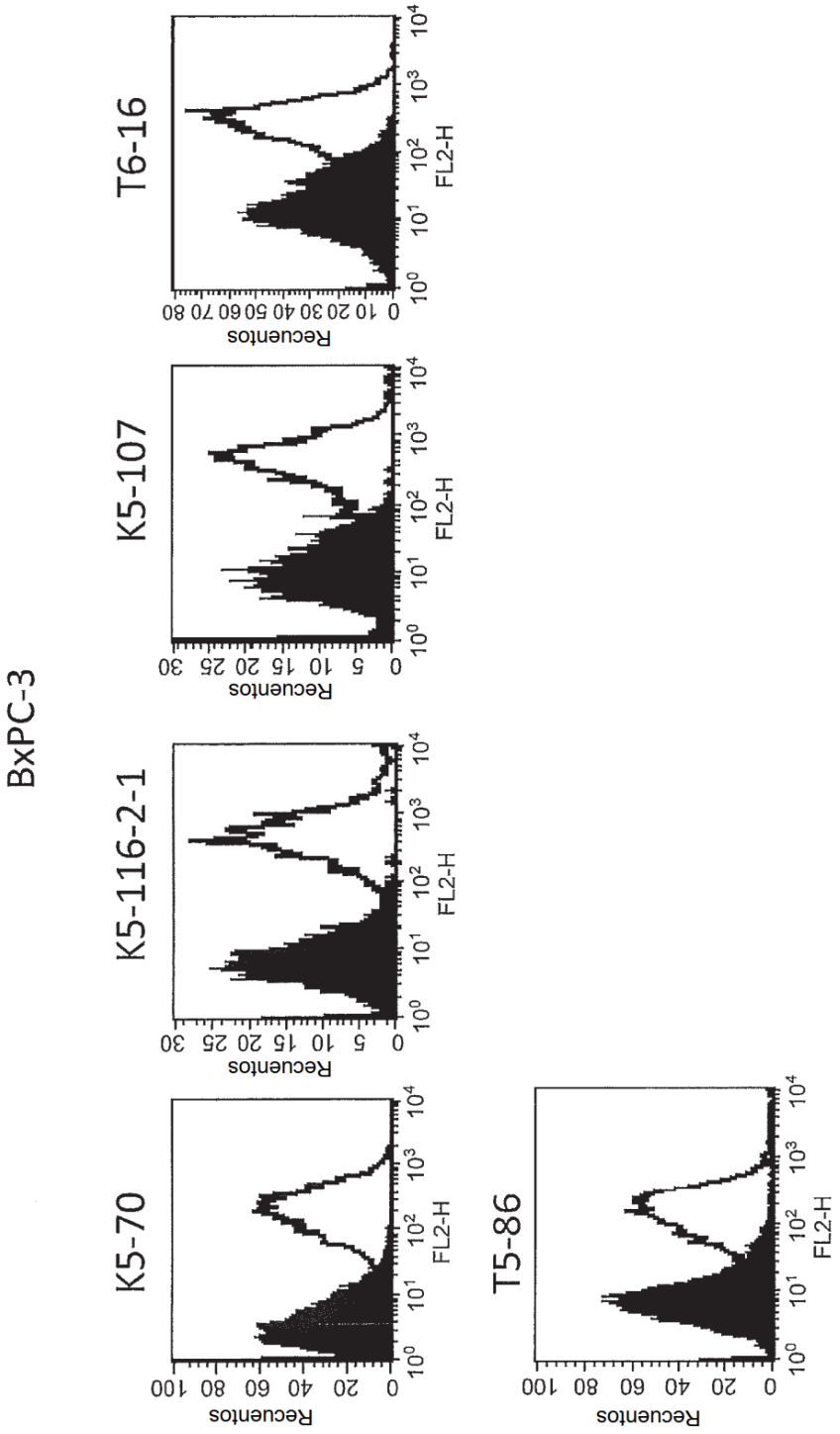


Fig. 5

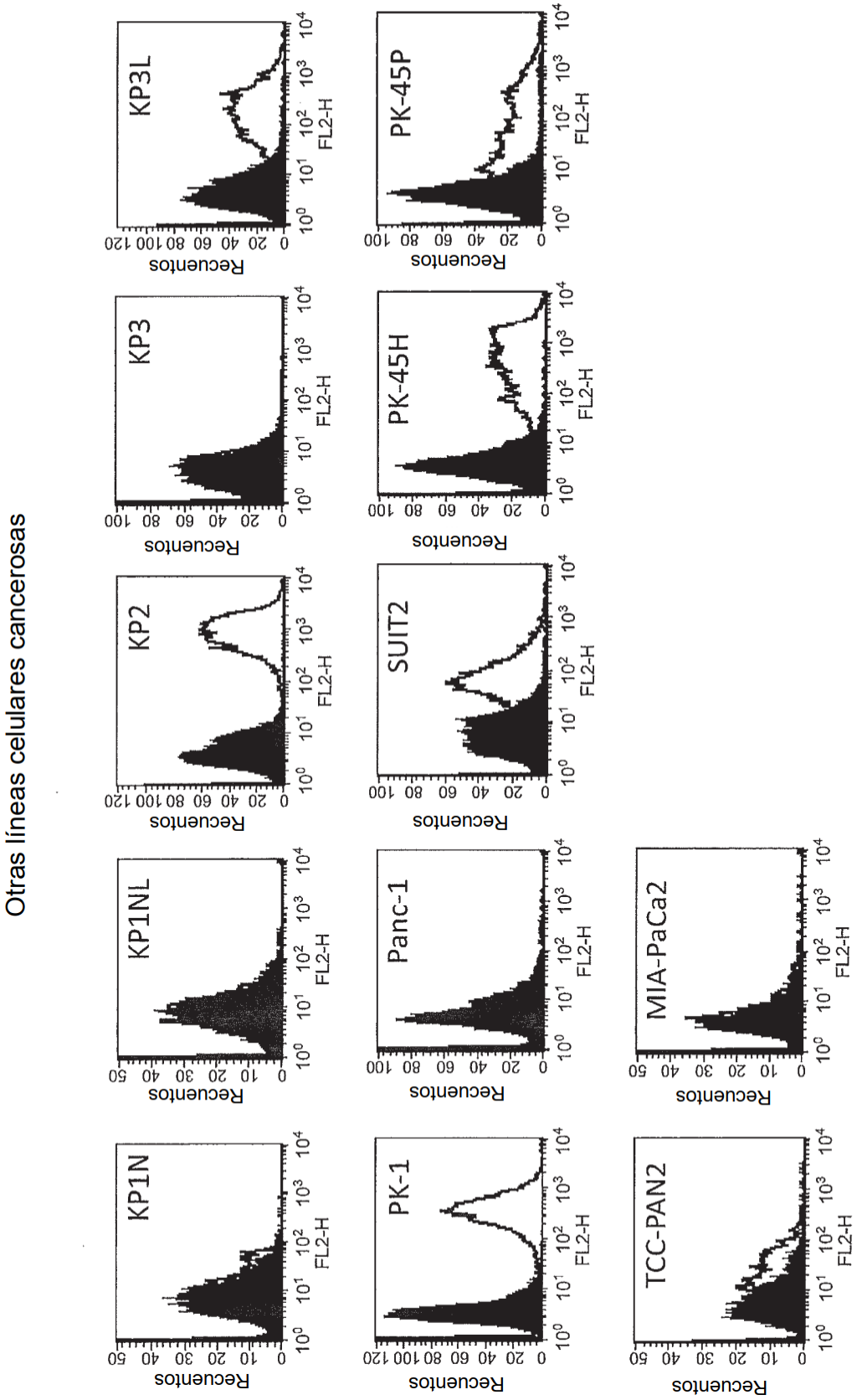

Otras líneas celulares cancerosas
KP3L
KP3
KP2
KP1NL
KP1N
PK-45P
PK-45H
SUIT2
Panc-1
MIA-PaCa2
PK-1
TCC-PAN2
Recuentos
FL2-H

Fig. 6

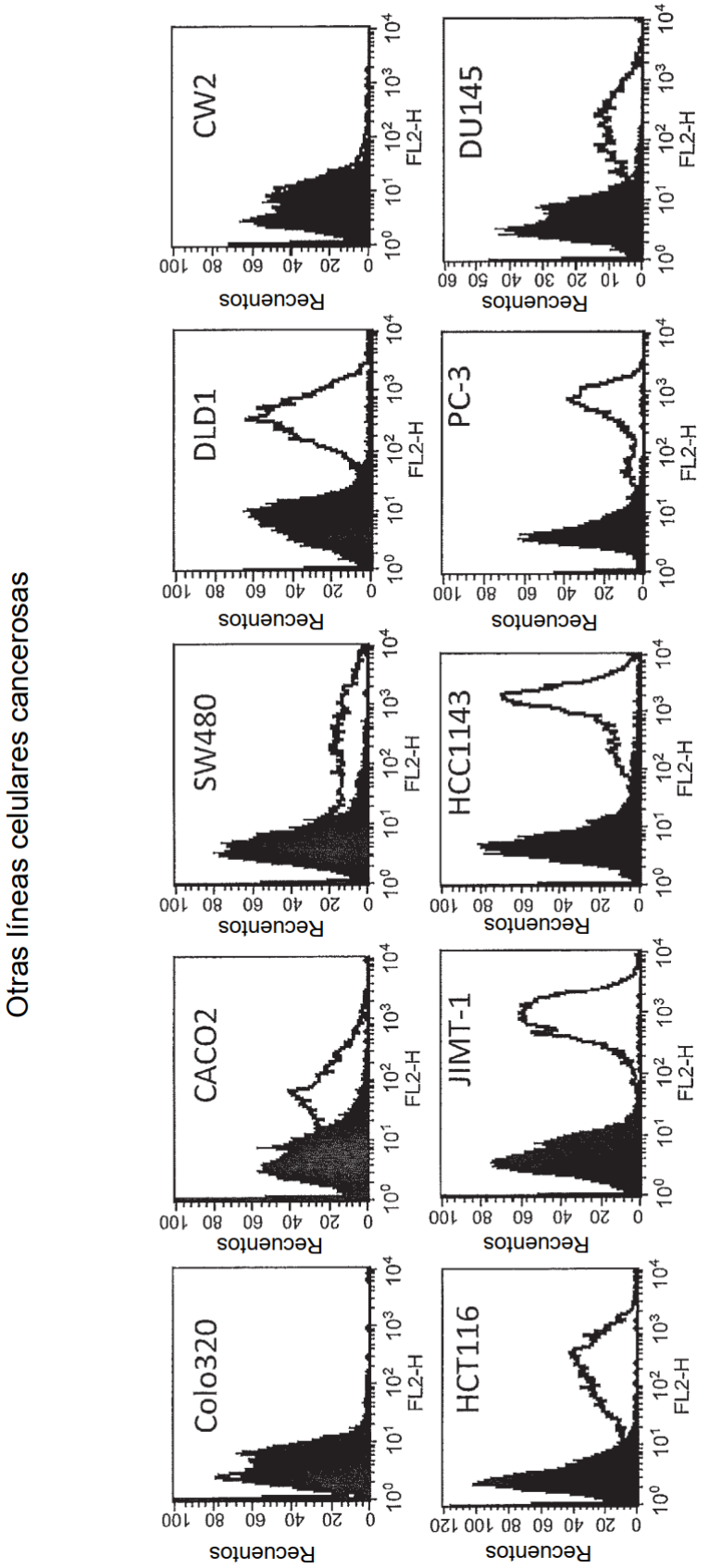

Otras líneas celulares cancerosas
Colo320
CACO2
SW480
DLD1
CW2
HCT116
JIMT-1
HCC1143
PC-3
DU145
Recuentos
FL2-H

Fig. 7

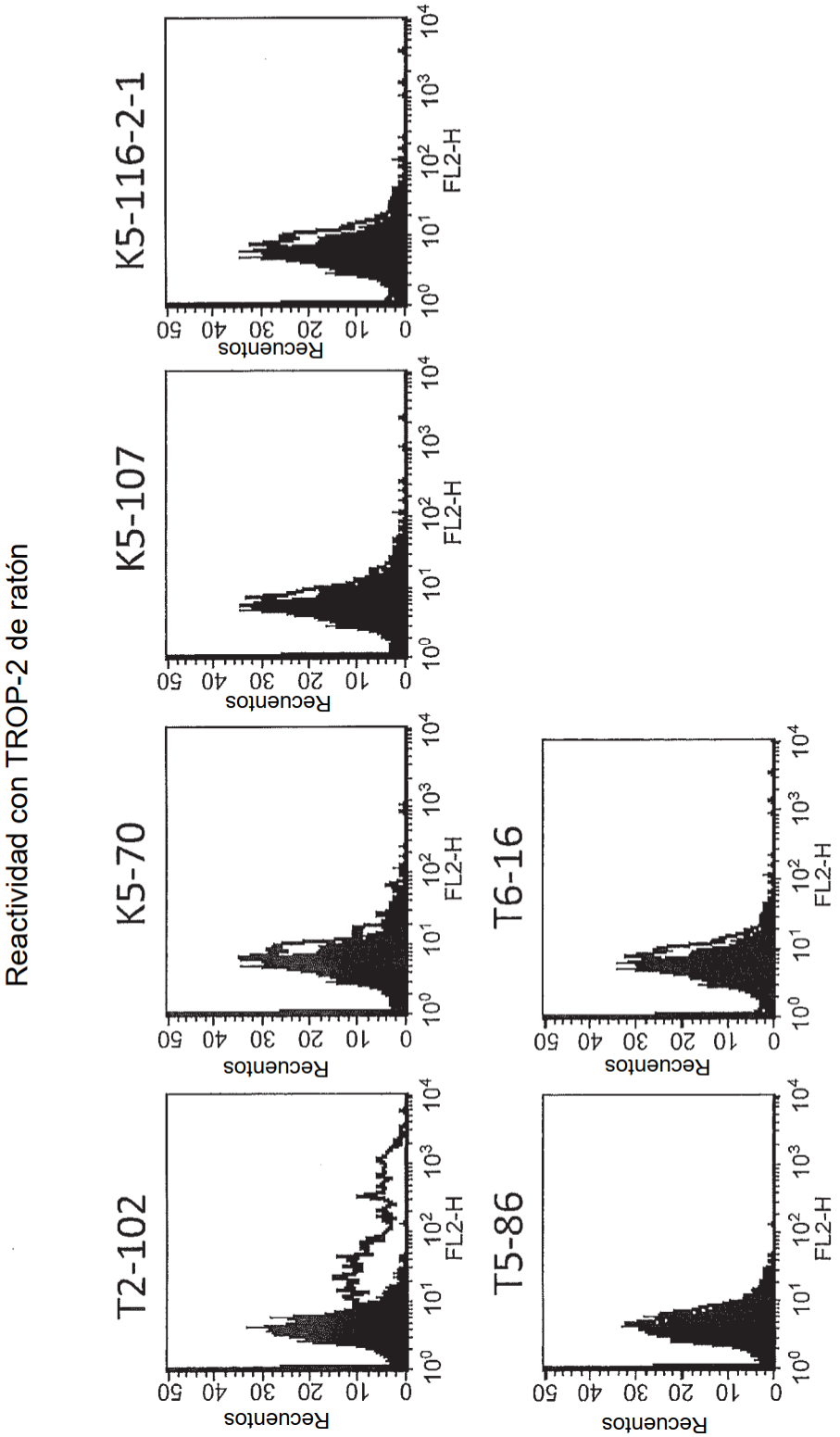

Reactividad con TROP-2 de ratón
K5-116-2-1
K5-107
K5-70
T6-16
T2-102
T5-86
Recuentos
FL2-H

Fig. 8

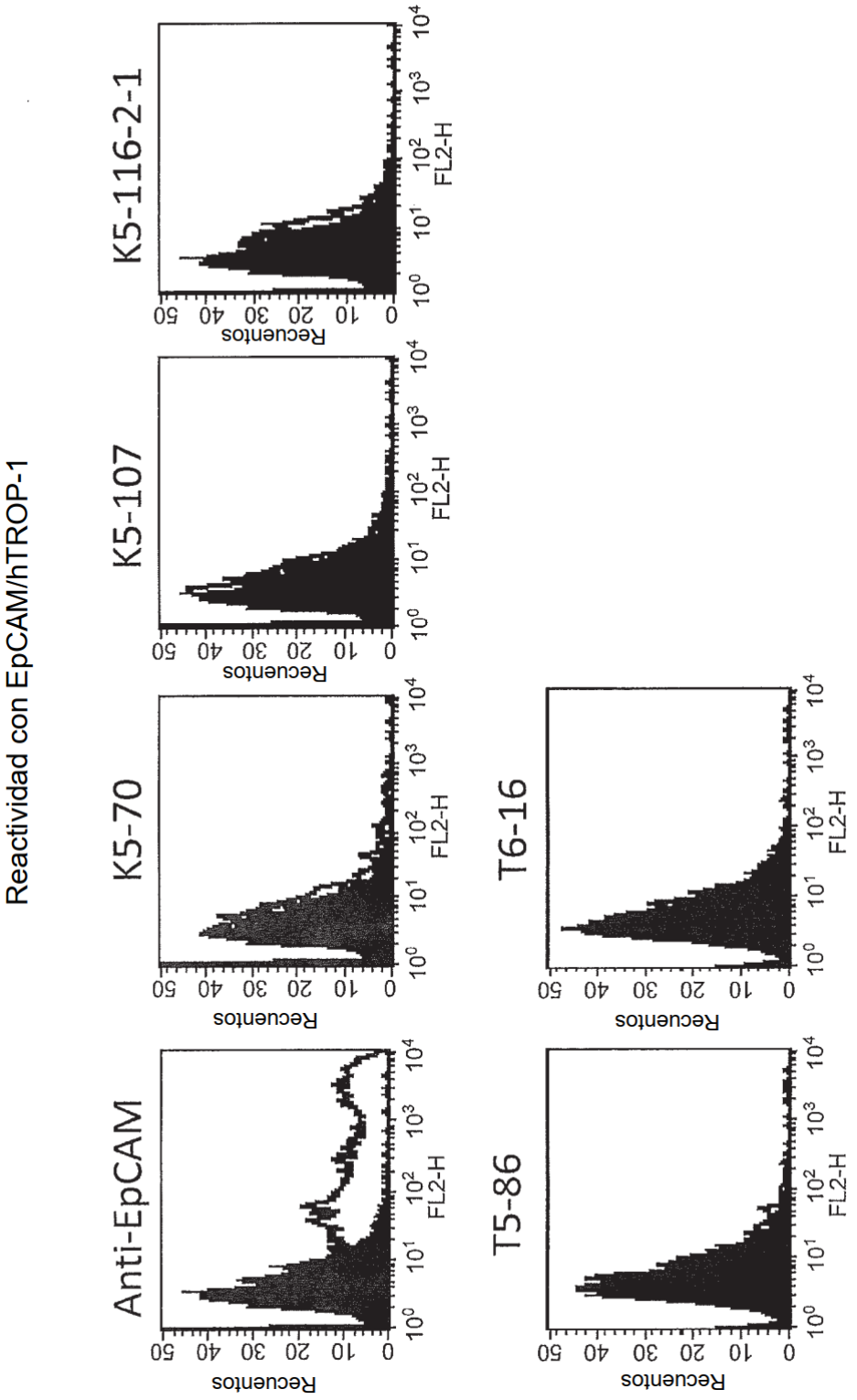

Reactividad con EpCAM/hTROP-1
Anti-EpCAM
K5-70
K5-107
K5-116-2-1
T5-86
T6-16
Recuentos
FL2-H

Fig.9

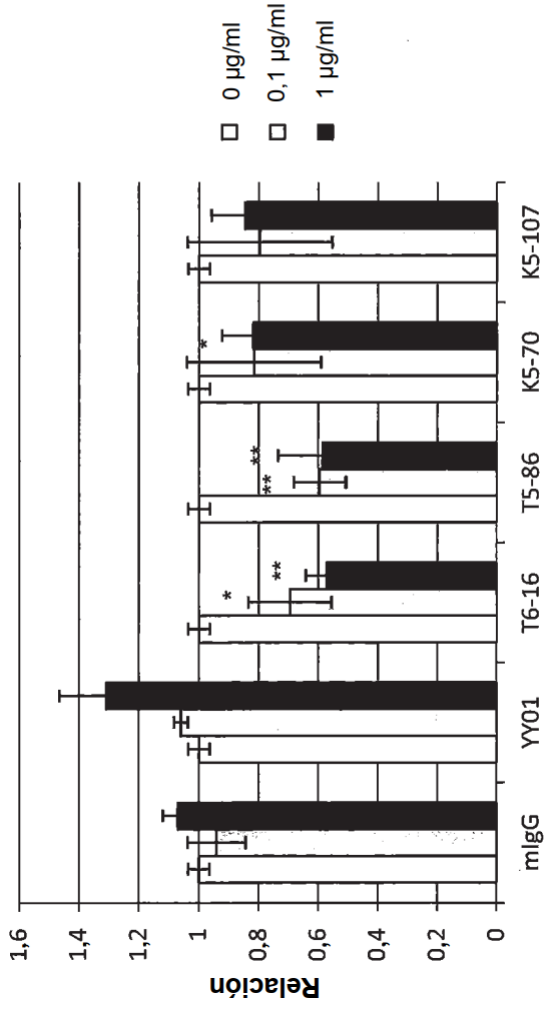

0 µg/ml
0,1 µg/ml
1 µg/ml
Relación
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
mIgG
YY01
T6-16
T5-86
K5-70
K5-107
*
**
**
*
**

Fig.10

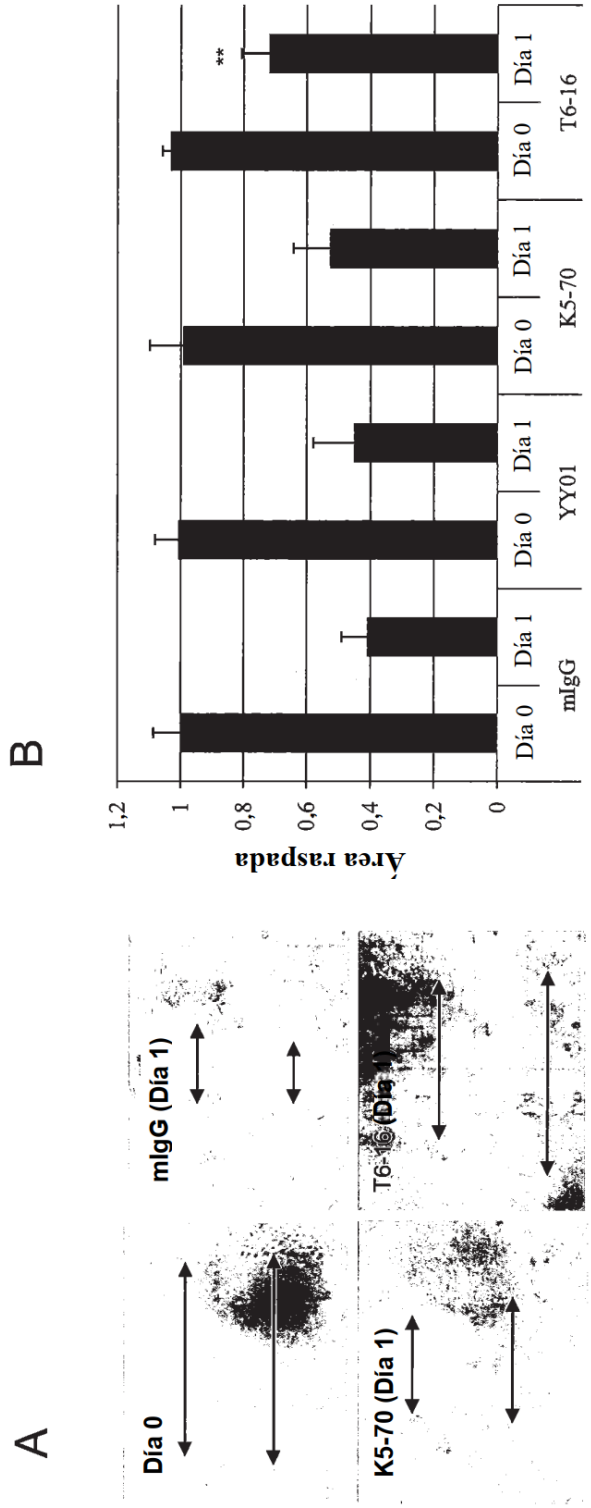

A
Día 0
mIgG (Día 1)
K5-70 (Día 1)
B
Área rasgada
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
**
Día 0
Día 1
mIgG
YY01
K5-70
T6-16

Fig. 11

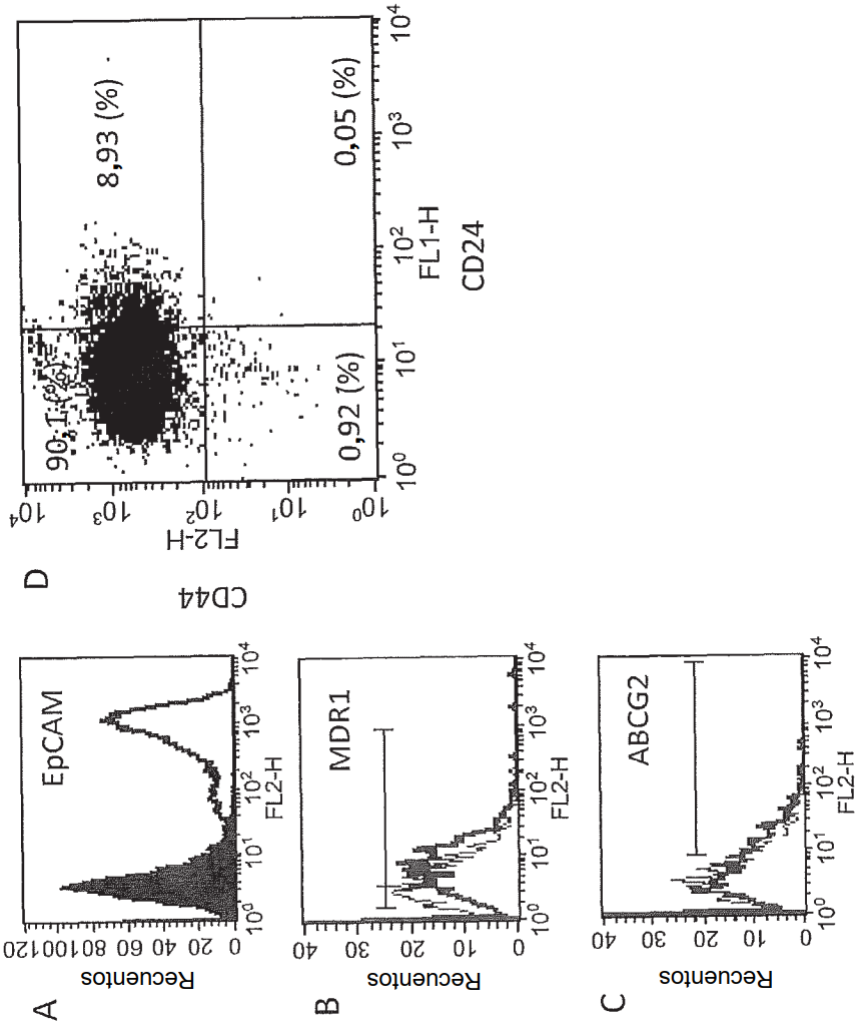

A
EpCAM
Recuentos
FL2-H
B
MDR1
Recuentos
FL2-H
C
ABCG2
Recuentos
FL2-H
D
CD44
FL2-H
CD24
FL1-H
8,93 (%)
0,05 (%)
0,92 (%)

Fig.12

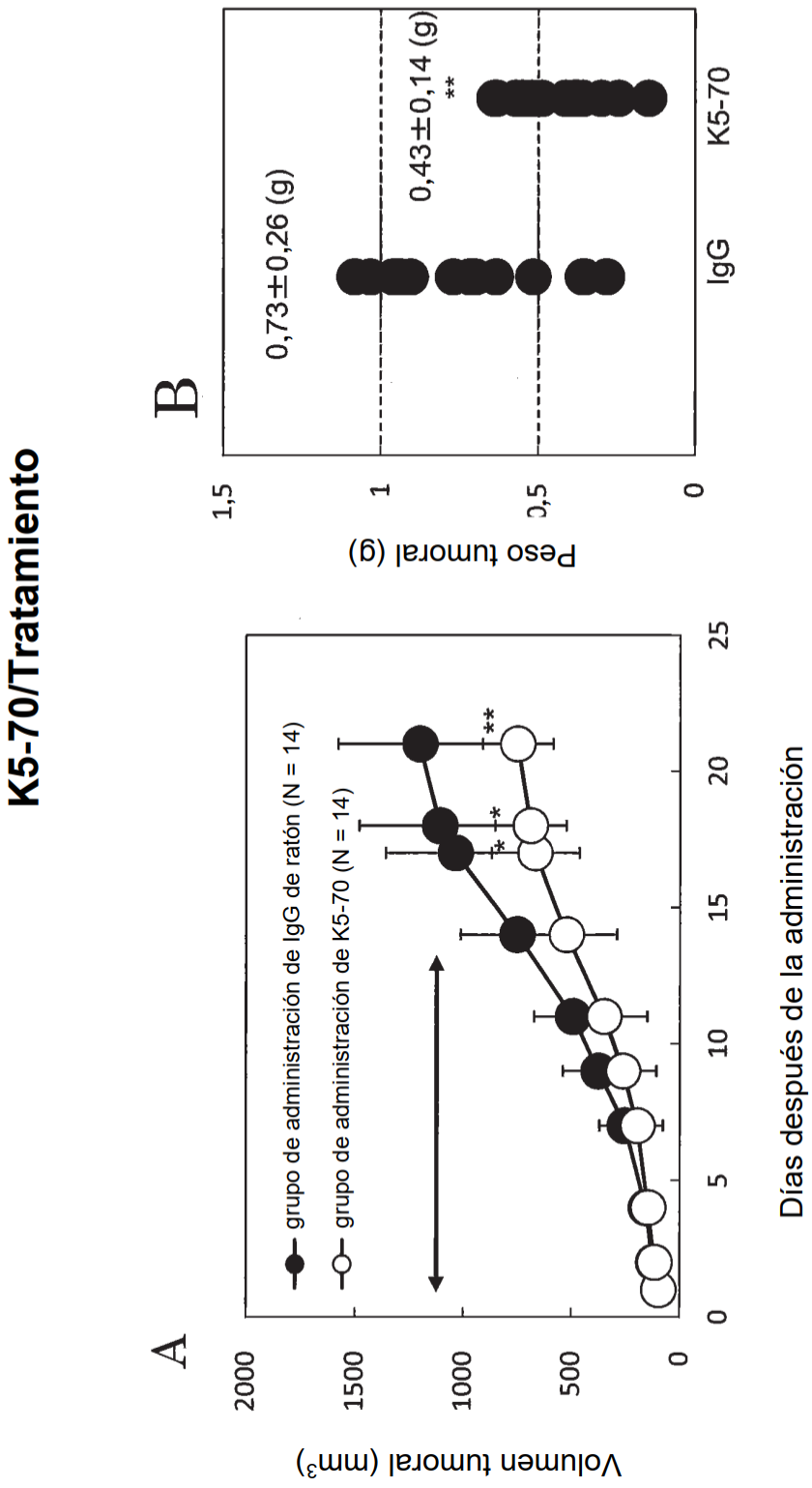

K5-70/Tratamiento
A
Volumen tumoral (mm³)
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
Días después de la administración
grupo de administración de IgG de ratón (N = 14)
grupo de administración de K5-70 (N = 14)
*
**
B
Peso tumoral (g)
1,5
1
0,5
0
0,73±0,26 (g)
0,43±0,14 (g)
**
IgG
K5-70

Fig.13

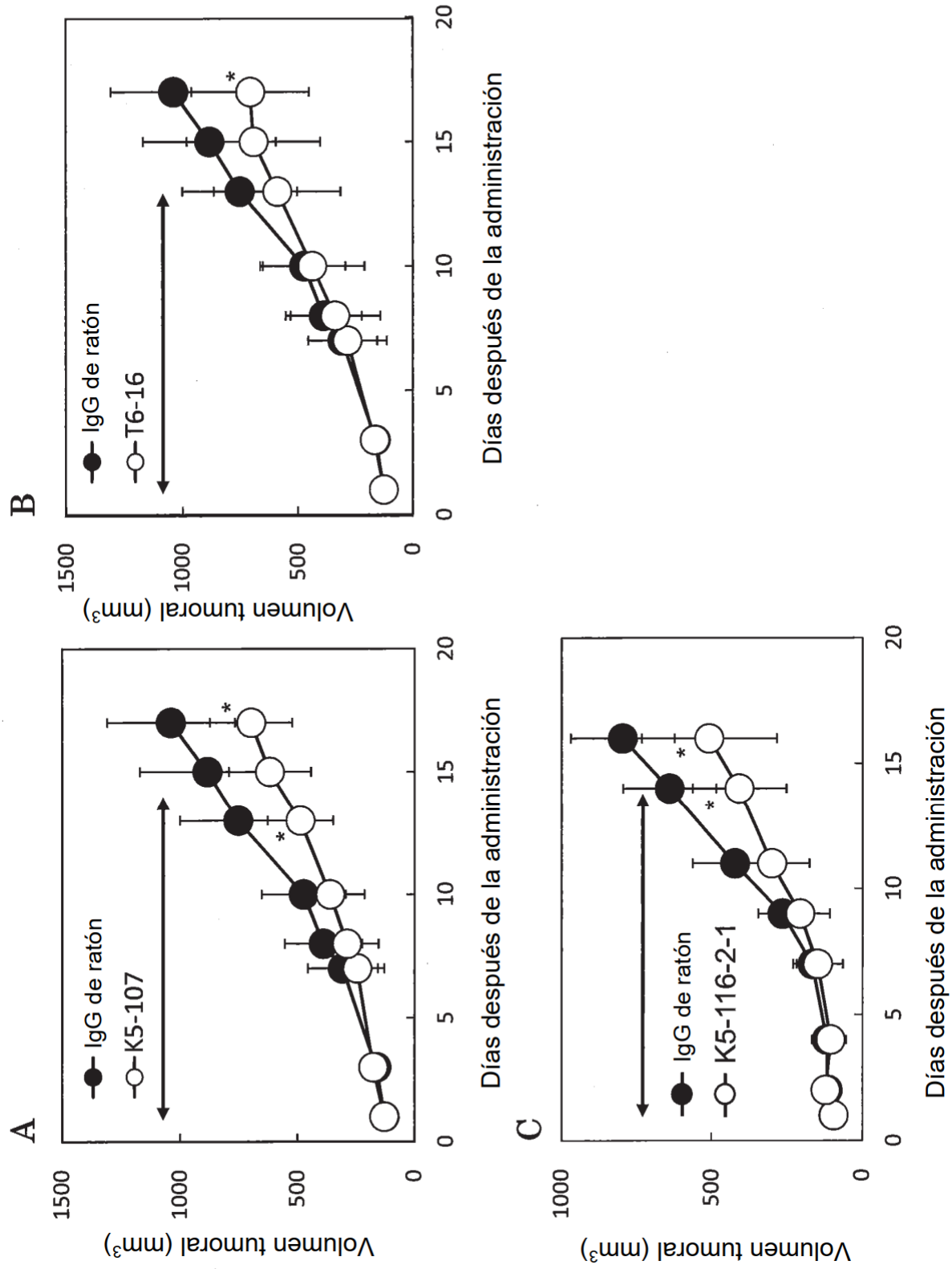

A
B
C
IgG de ratón
K5-107
T6-16
K5-116-2-1
Volumen tumoral (mm³)
Días después de la administración
0
500
1000
1500
5
10
15
20
*

Fig.14

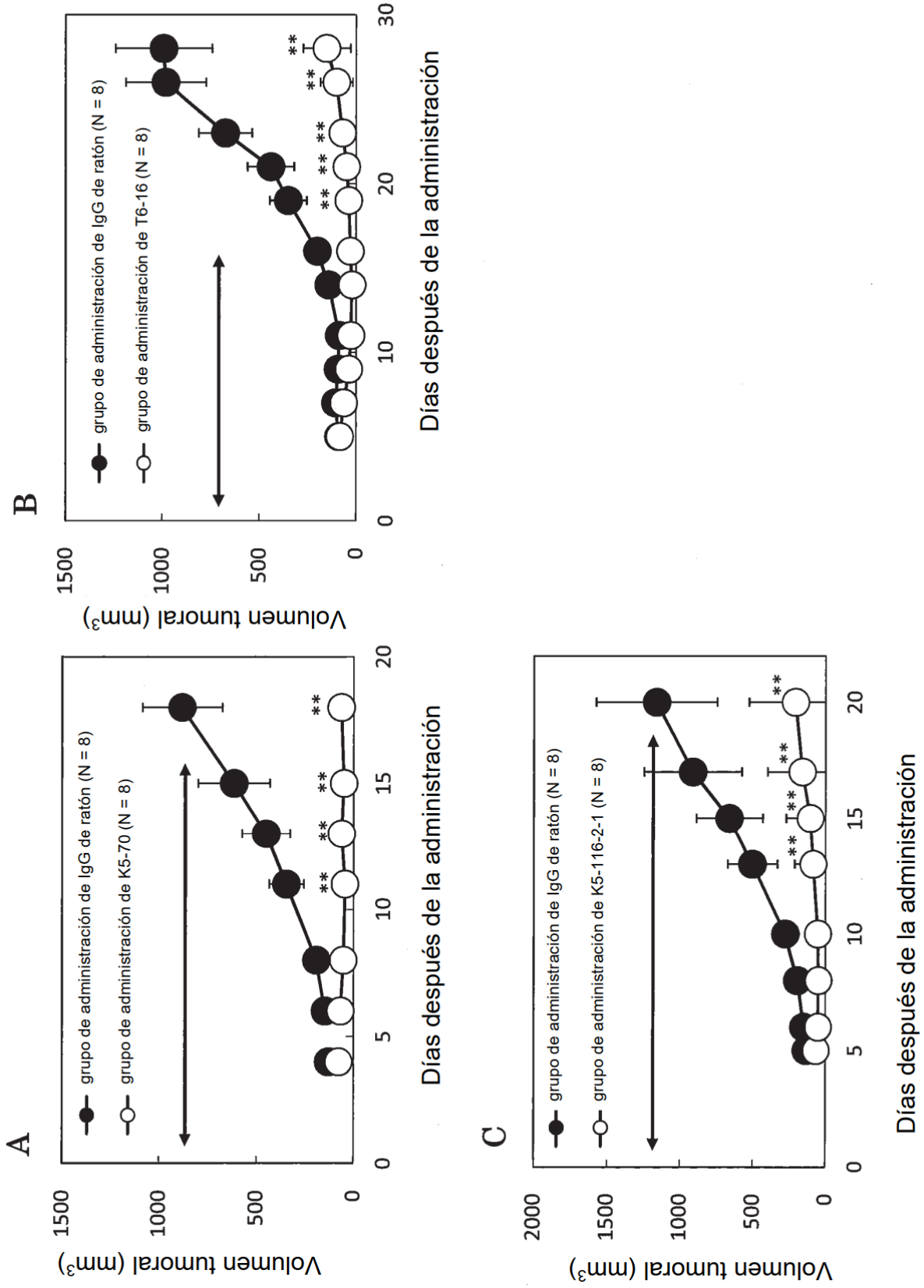

A
B
C
Volumen tumoral (mm³)
Días después de la administración
grupo de administración de IgG de ratón (N = 8)
grupo de administración de K5-70 (N = 8)
grupo de administración de T6-16 (N = 8)
grupo de administración de K5-116-2-1 (N = 8)
**

Fig.15

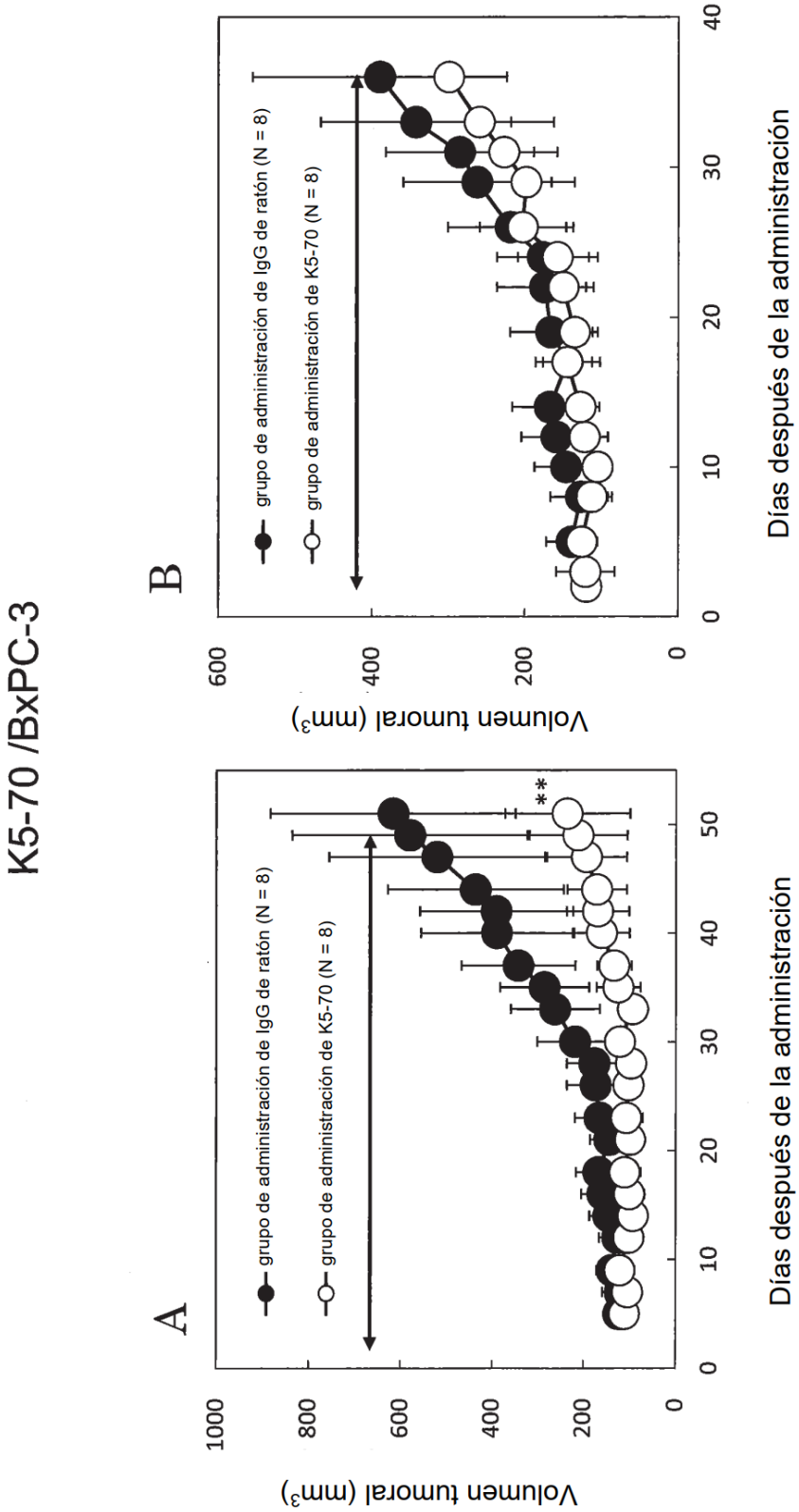

K5-70 /BxPC-3
A
B
grupo de administración de IgG de ratón (N = 8)
grupo de administración de K5-70 (N = 8)
**
Volumen tumoral (mm³)
Días después de la administración
0
200
400
600
800
1000
10
20
30
40
50

Fig.16

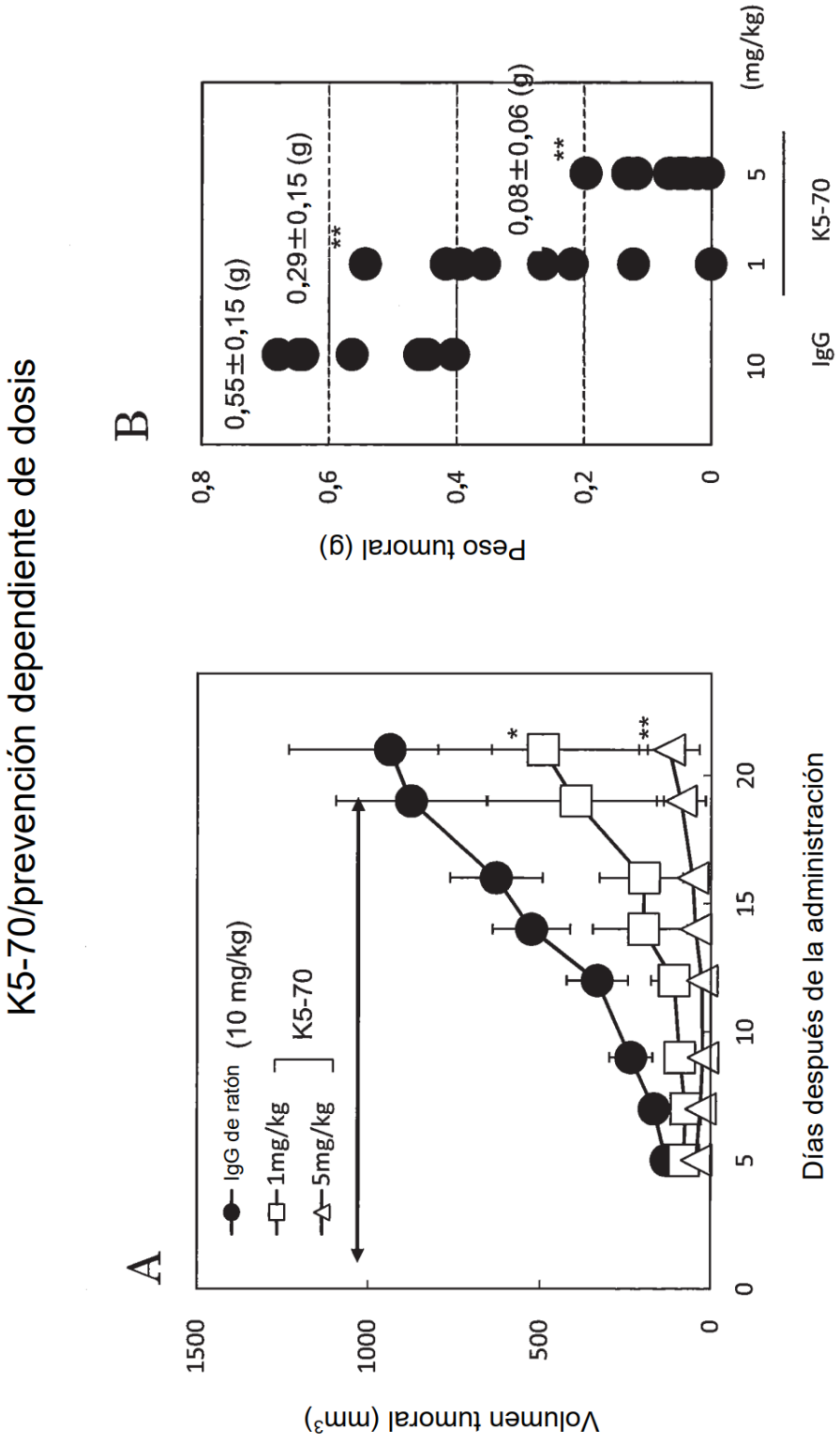

K5-70/prevención dependiente de dosis
A
IgG de ratón (10 mg/kg)
1mg/kg
5mg/kg
K5-70
Volumen tumoral (mm³)
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
Días después de la administración
*
**
B
0,55±0,15 (g)
0,29±0,15 (g)
0,08±0,06 (g)
**
**
Peso tumoral (g)
0,8
0,6
0,4
0,2
0
10
1
5
(mg/kg)
IgG
K5-70

Fig.17

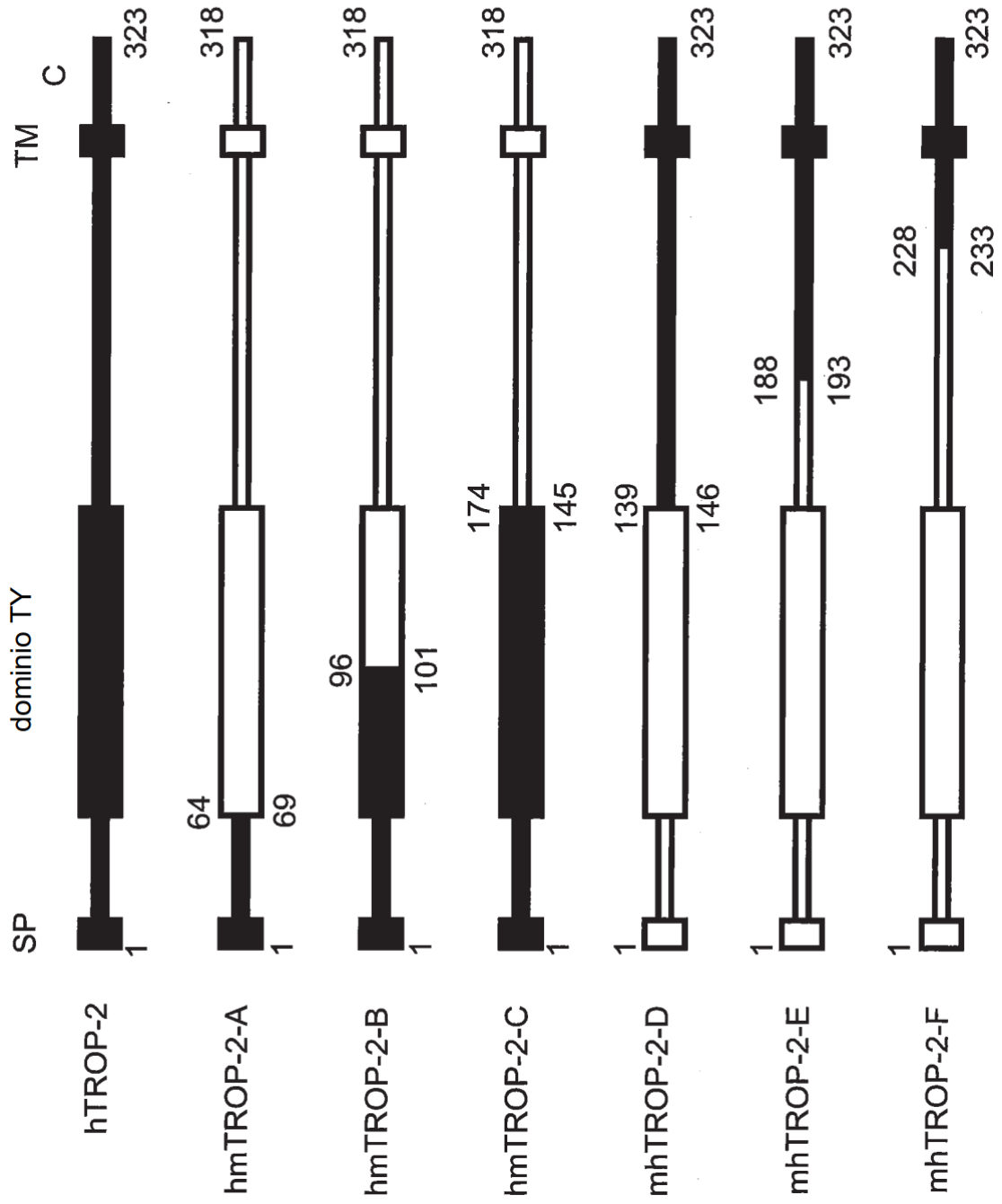

SP
dominio TY
TM
C
hTROP-2
1
323
hmTROP-2-A
1
64
69
318
hmTROP-2-B
1
96
101
318
hmTROP-2-C
1
174
145
318
mhTROP-2-D
1
139
146
323
mhTROP-2-E
1
188
193
323
mhTROP-2-F
1
228
233
323

Fig. 18

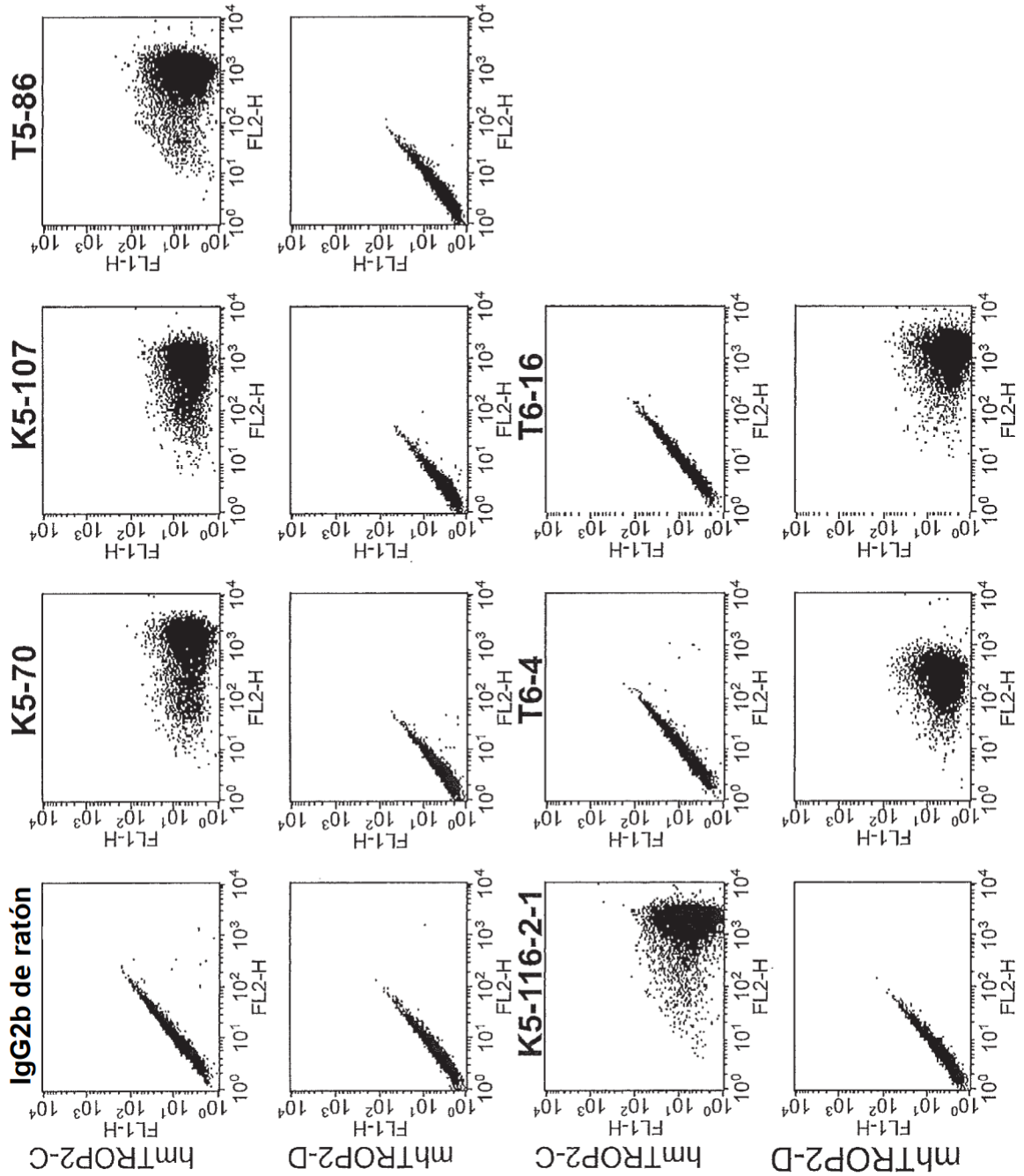

IgG2b de ratón
K5-70
K5-107
T5-86
T6-4
T6-16
K5-116-2-1
hmTROP2-C
mhTROP2-D
hmTROP2-C
mhTROP2-D
FL1-H
FL2-H

Fig. 19

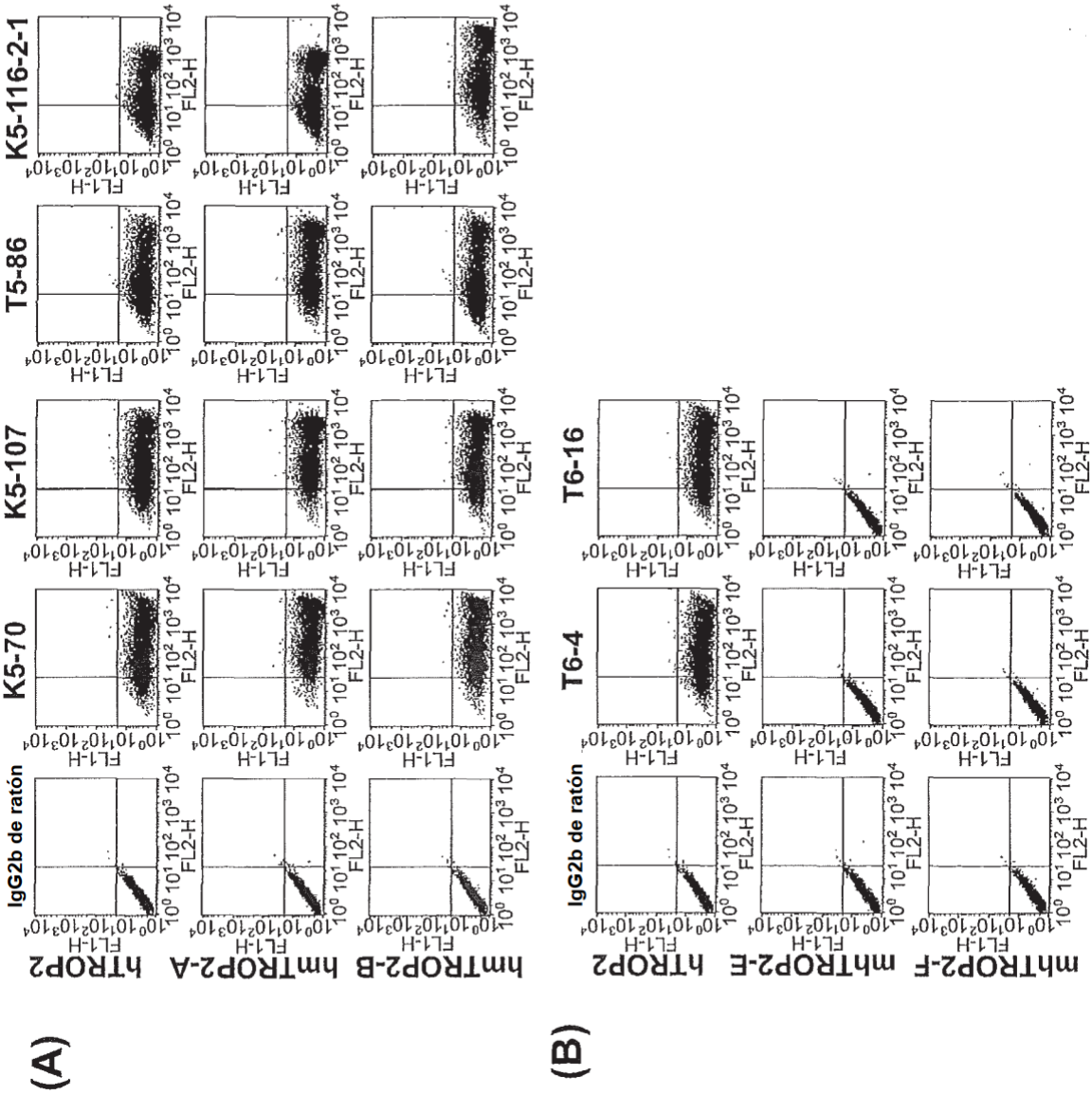

(A)
IgG2b de ratón
K5-70
K5-107
T5-86
K5-116-2-1
hTROP2
hmTROP2-A
hmTROP2-B
(B)
T6-4
T6-16
mhTROP2-E
mhTROP2-F

Fig.20

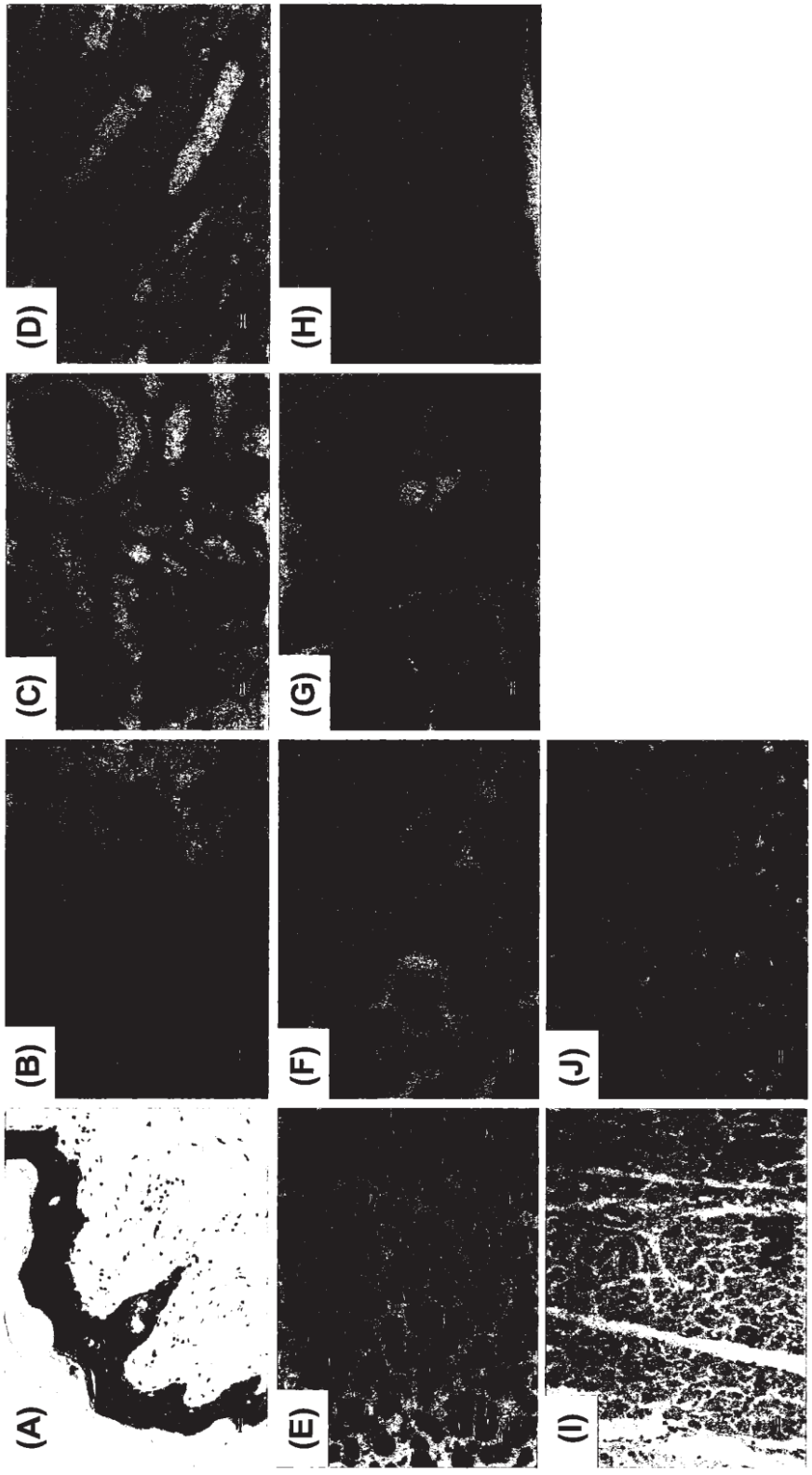


Fig.21

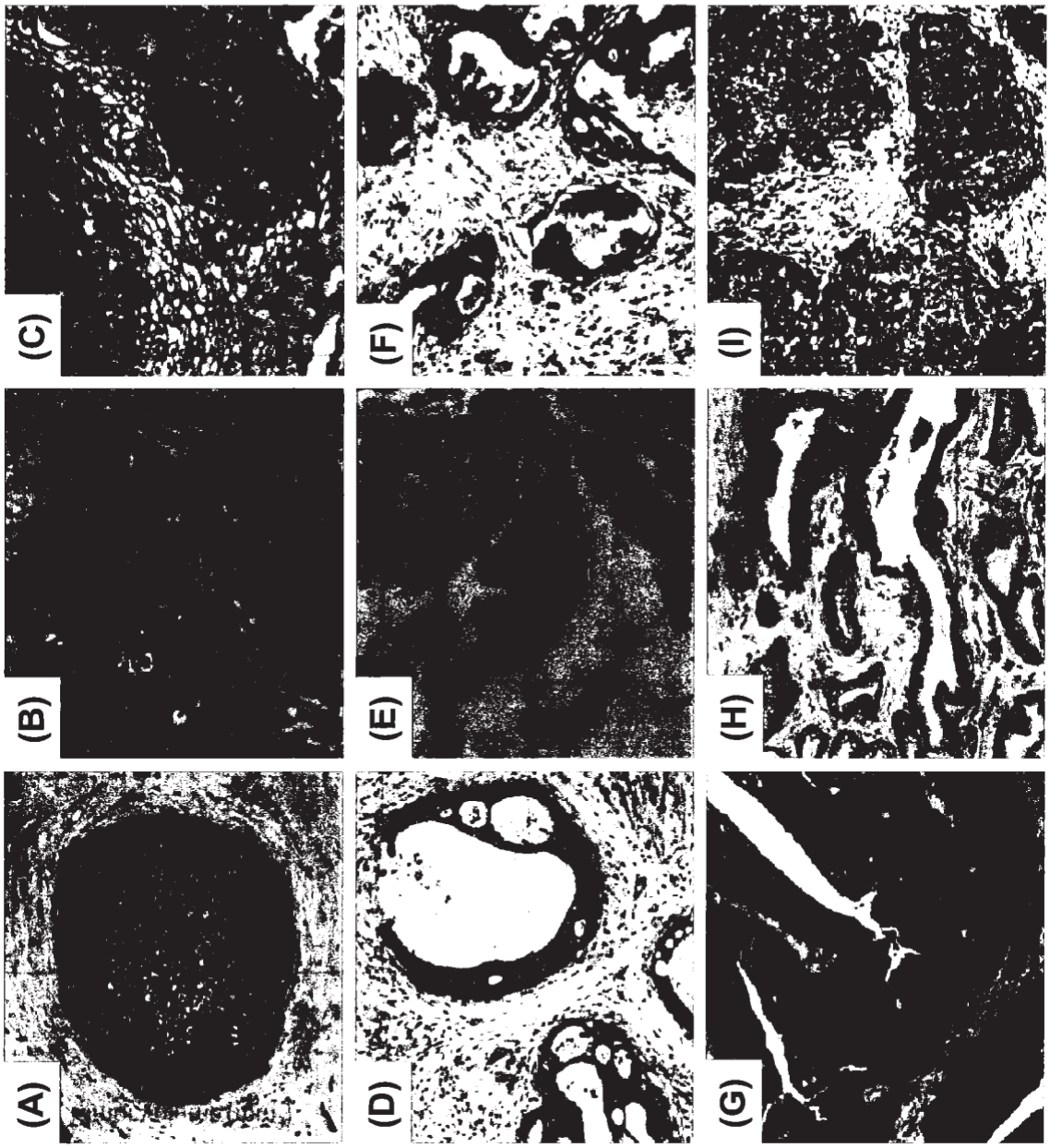


Fig.22

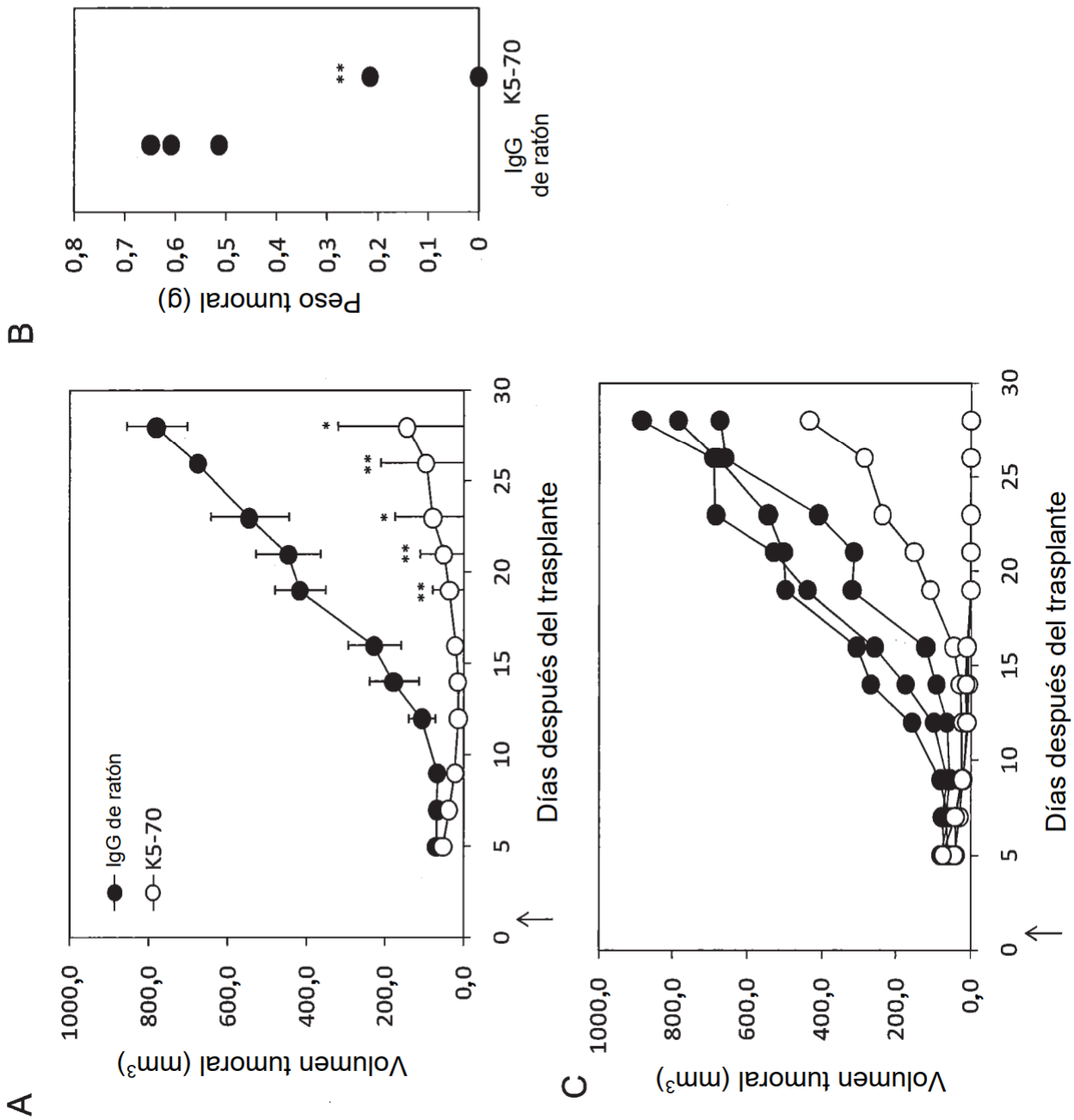

A
B
C
Volumen tumoral (mm³)
Días después del trasplante
IgG de ratón
K5-70
Peso tumoral (g)
IgG de ratón
K5-70
0,0
200,0
400,0
600,0
800,0
1000,0
0
5
10
15
20
25
30
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
*
**

Fig.23

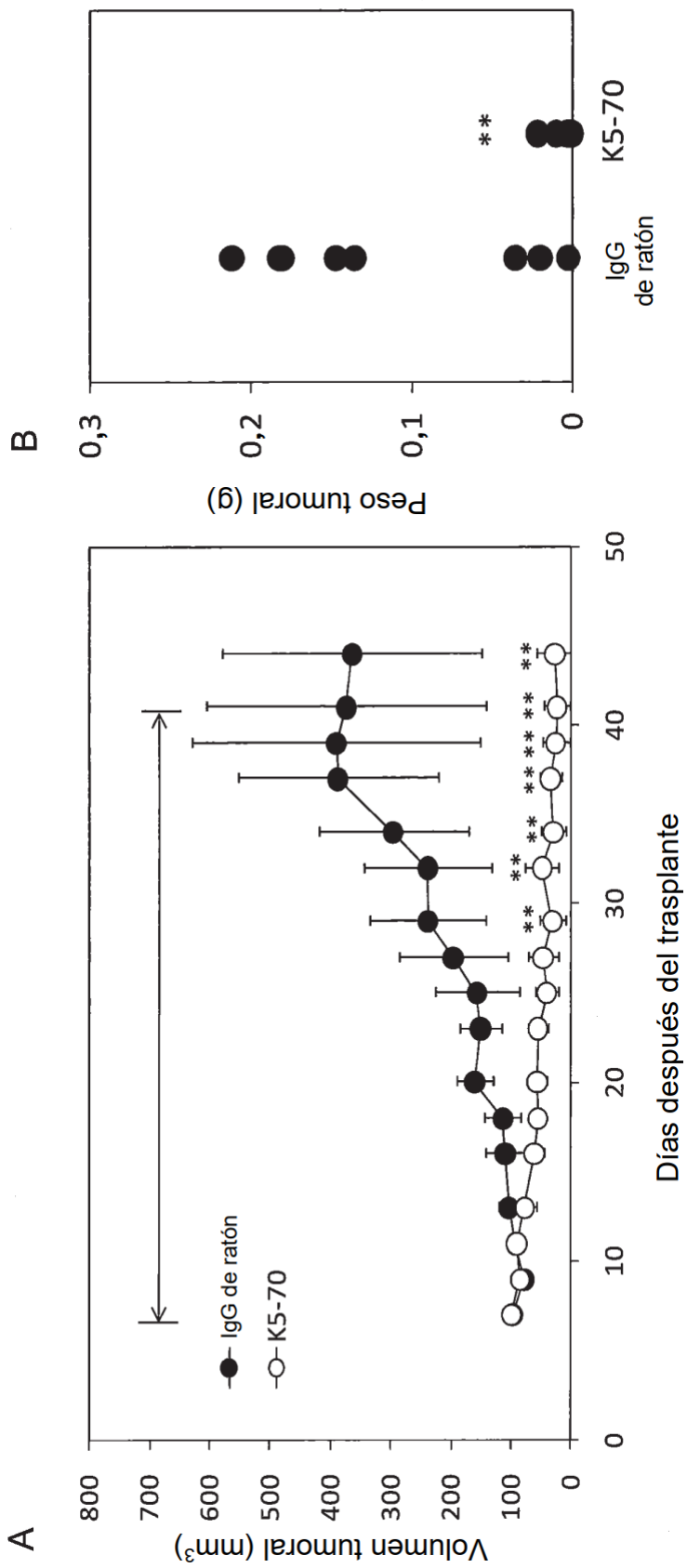

A
Volumen tumoral (mm³)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
Días después del trasplante
IgG de ratón
K5-70
**
B
Peso tumoral (g)
0,3
0,2
0,1
0
IgG de ratón
K5-70
**

Fig.24

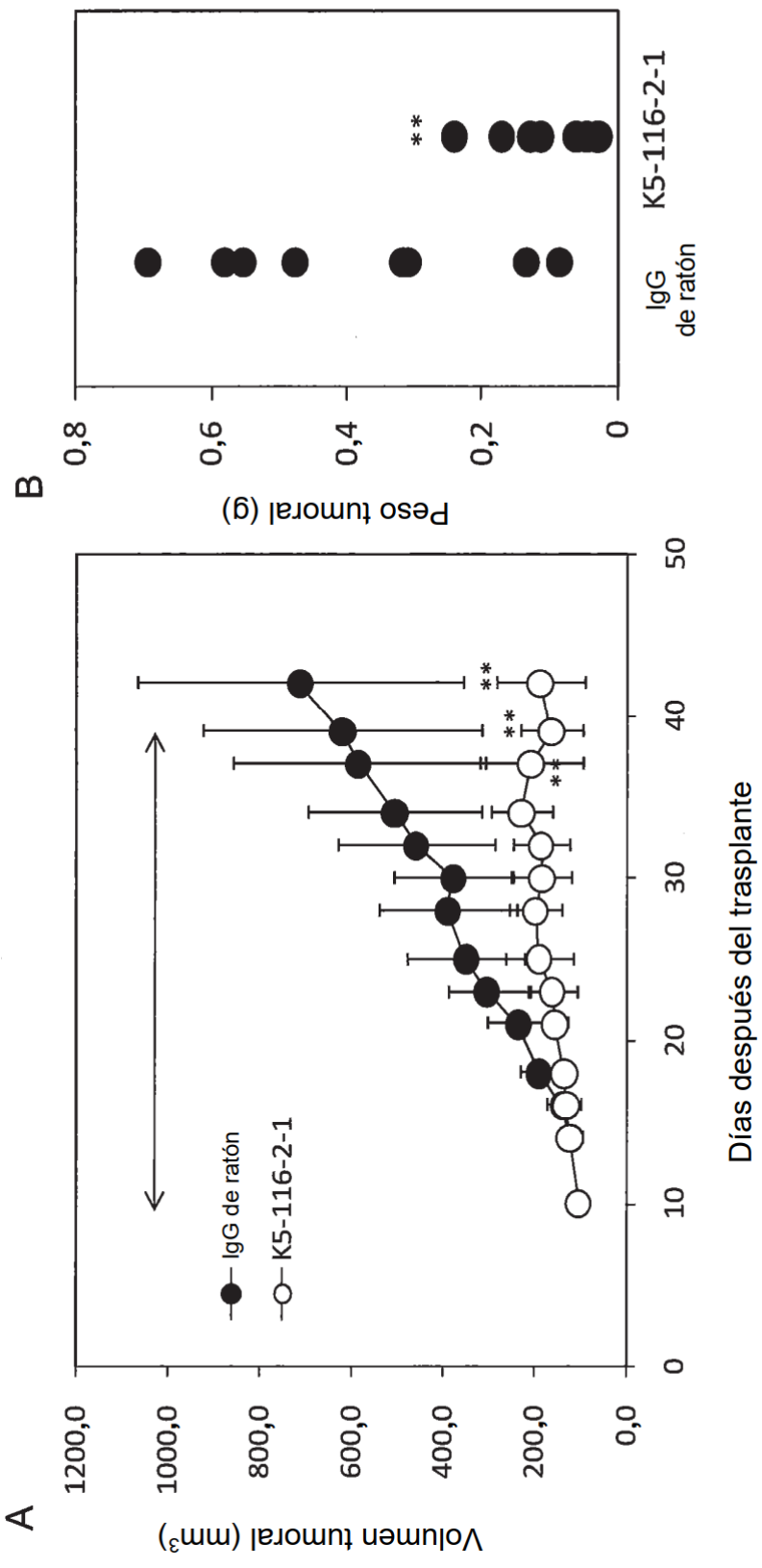

A
Volumen tumoral (mm³)
1200,0
1000,0
800,0
600,0
400,0
200,0
0,0
0
10
20
30
40
50
Días después del trasplante
IgG de ratón
K5-116-2-1
**
B
Peso tumoral (g)
0,8
0,6
0,4
0,2
0
IgG de ratón
K5-116-2-1
**

Fig.25

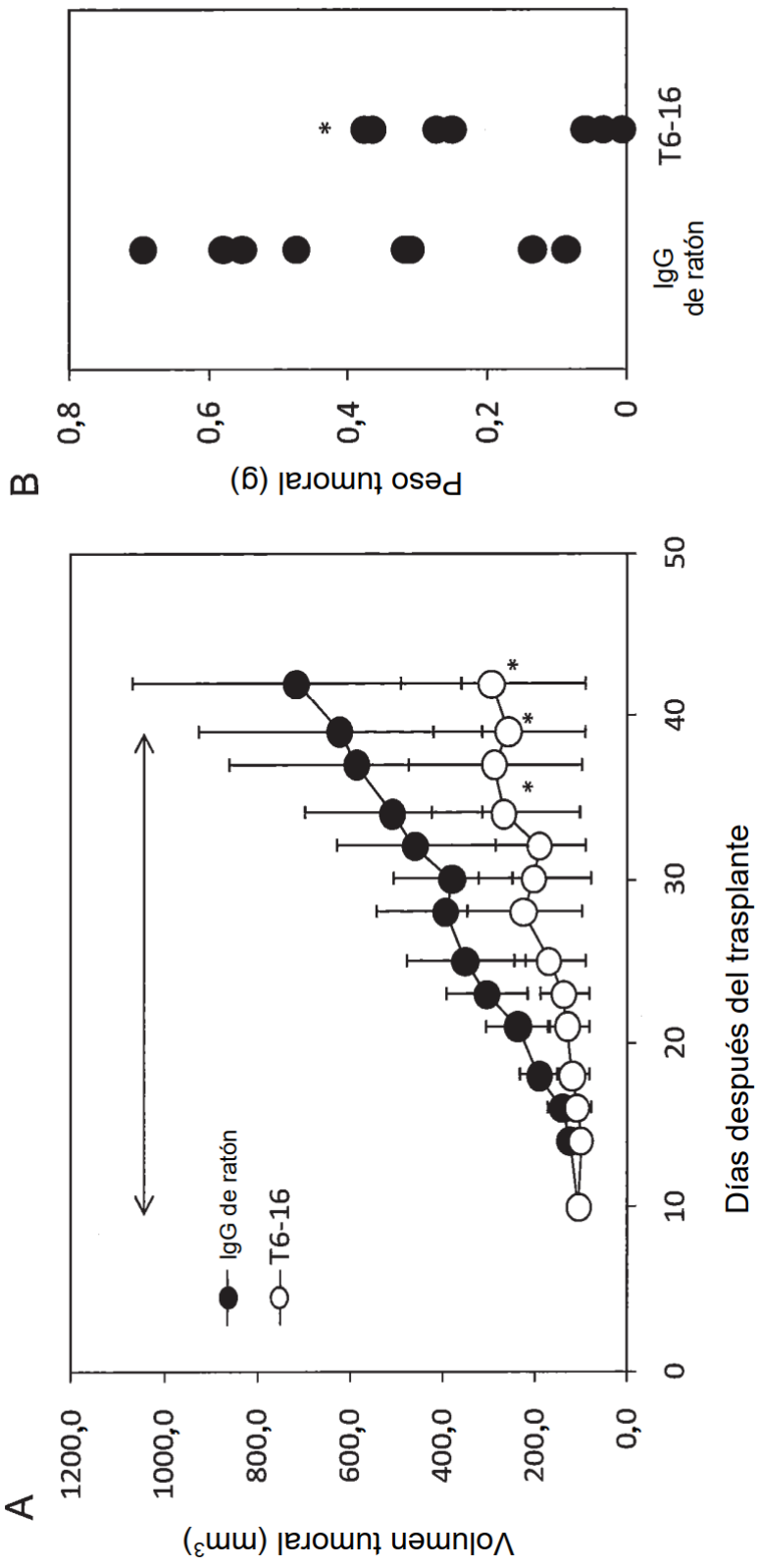

A
Volumen tumoral (mm³)
1200,0
1000,0
800,0
600,0
400,0
200,0
0,0
0
10
20
30
40
50
Días después del trasplante
IgG de ratón
T6-16
*
B
Peso tumoral (g)
0,8
0,6
0,4
0,2
0
IgG de ratón
T6-16
*

Fig.26

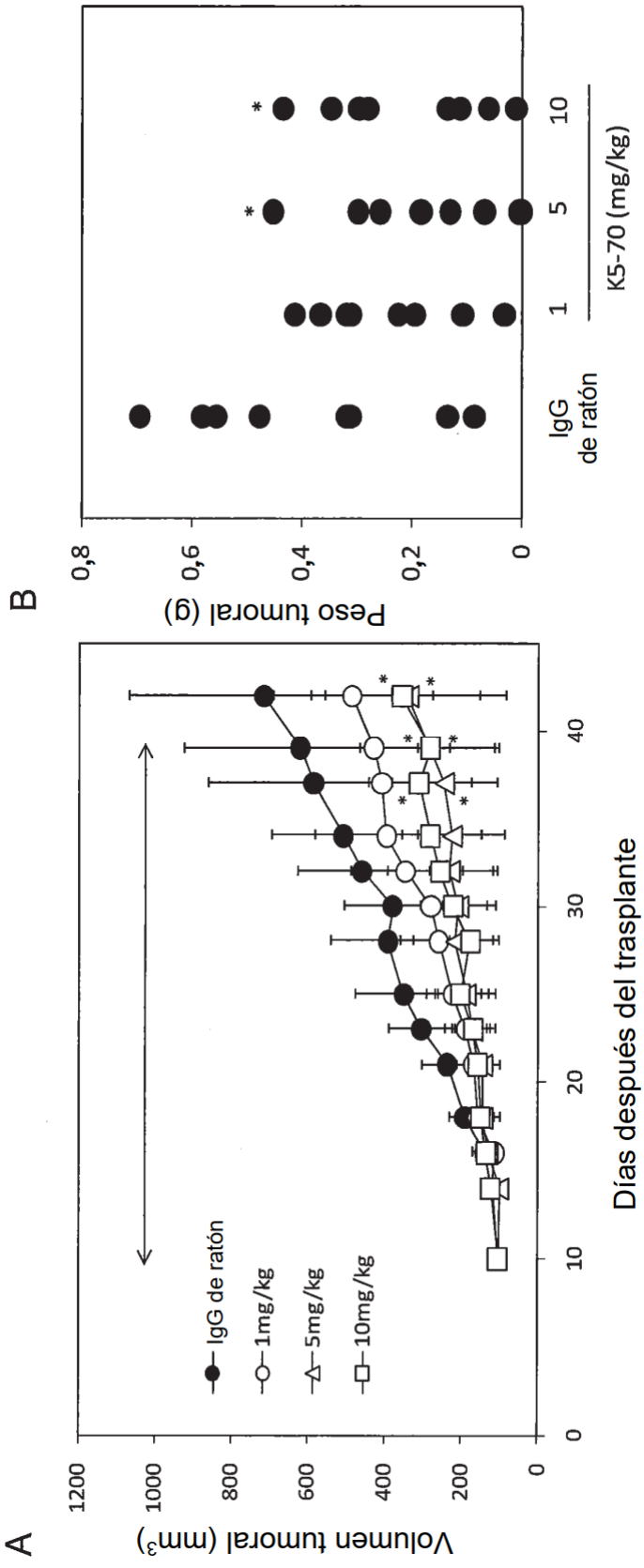

A
Volumen tumoral (mm³)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
Días después del trasplante
IgG de ratón
1mg/kg
5mg/kg
10mg/kg
B
Peso tumoral (g)
0,8
0,6
0,4
0,2
0
IgG de ratón
1
5
10
K5-70 (mg/kg)

Fig.27

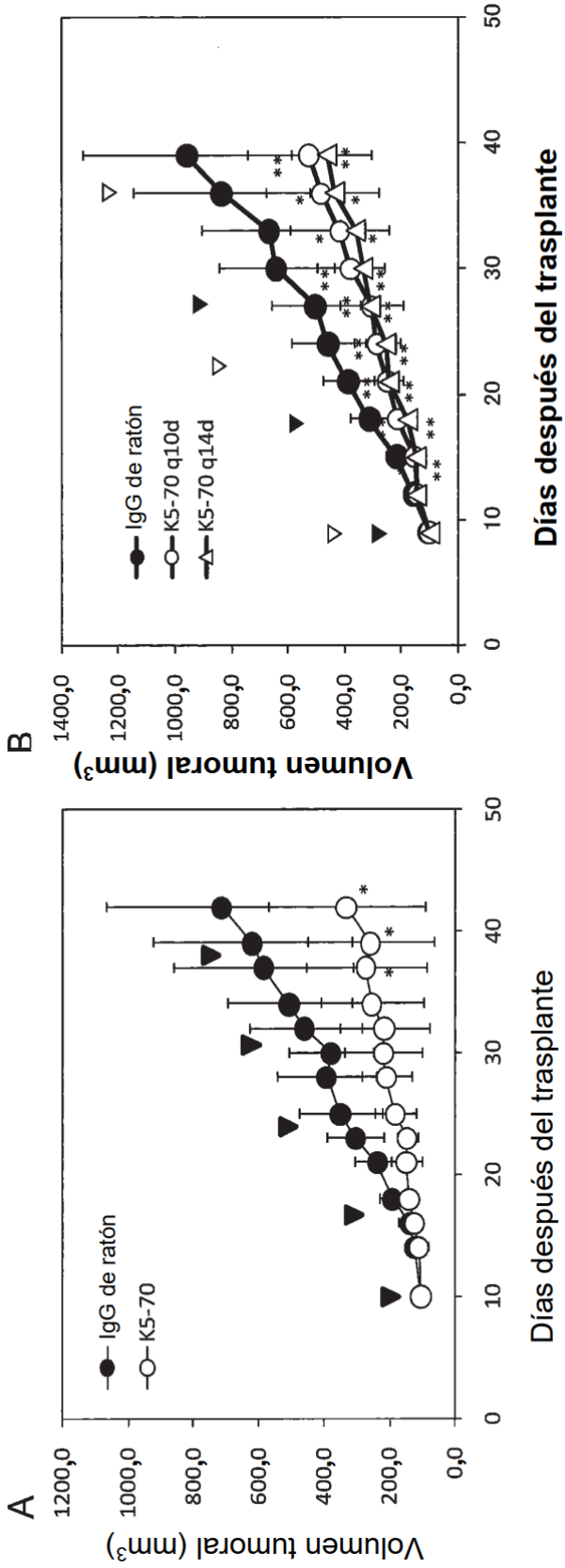

A
Volumen tumoral (mm³)
1200,0
1000,0
800,0
600,0
400,0
200,0
0,0
0
10
20
30
40
50
Días después del trasplante
IgG de ratón
K5-70
B
Volumen tumoral (mm³)
1400,0
1200,0
1000,0
800,0
600,0
400,0
200,0
0,0
0
10
20
30
40
50
Días después del trasplante
IgG de ratón
K5-70 q10d
K5-70 q14d

Fig.28

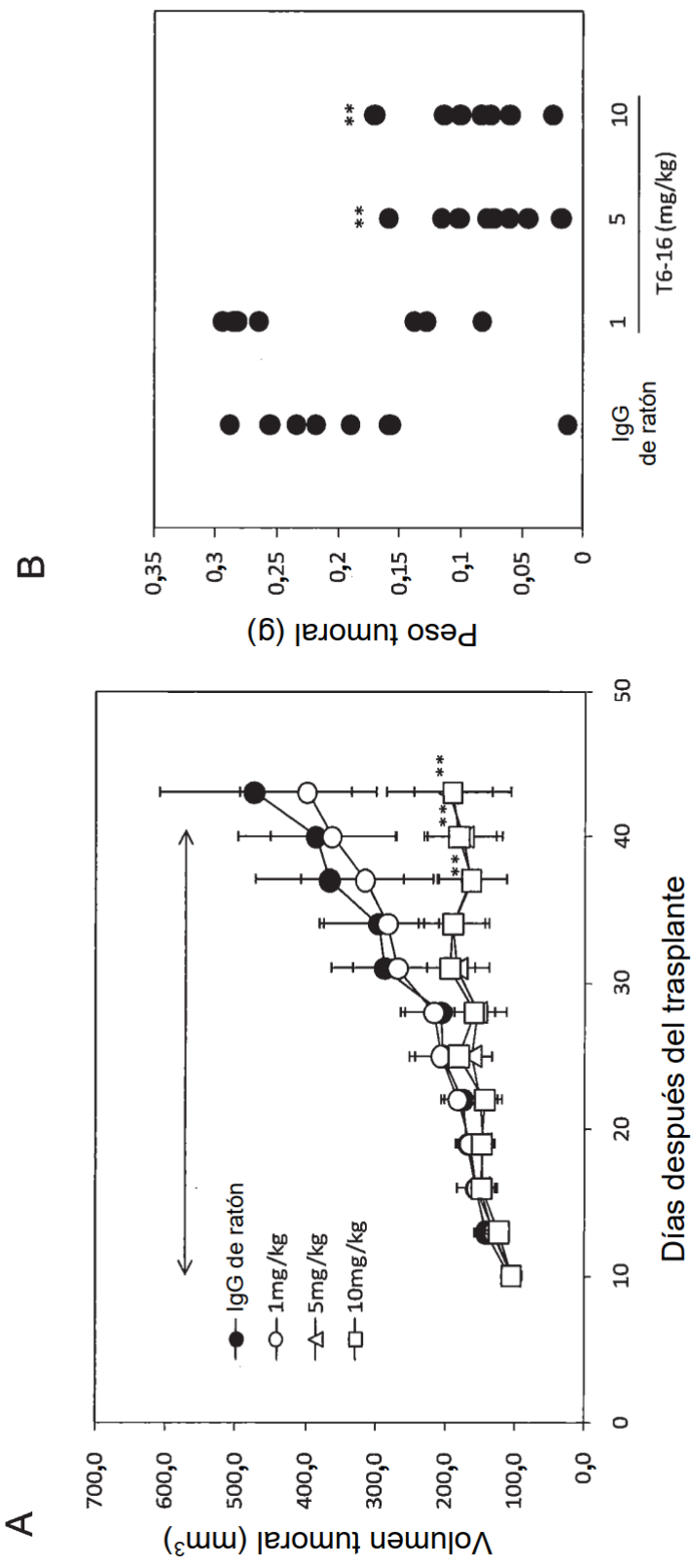

A
Volumen tumoral (mm³)
700,0
600,0
500,0
400,0
300,0
200,0
100,0
0,0
0
10
20
30
40
50
Días después del trasplante
IgG de ratón
1mg/kg
5mg/kg
10mg/kg
**
B
Peso tumoral (g)
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
IgG de ratón
1
5
10
T6-16 (mg/kg)

Fig.29

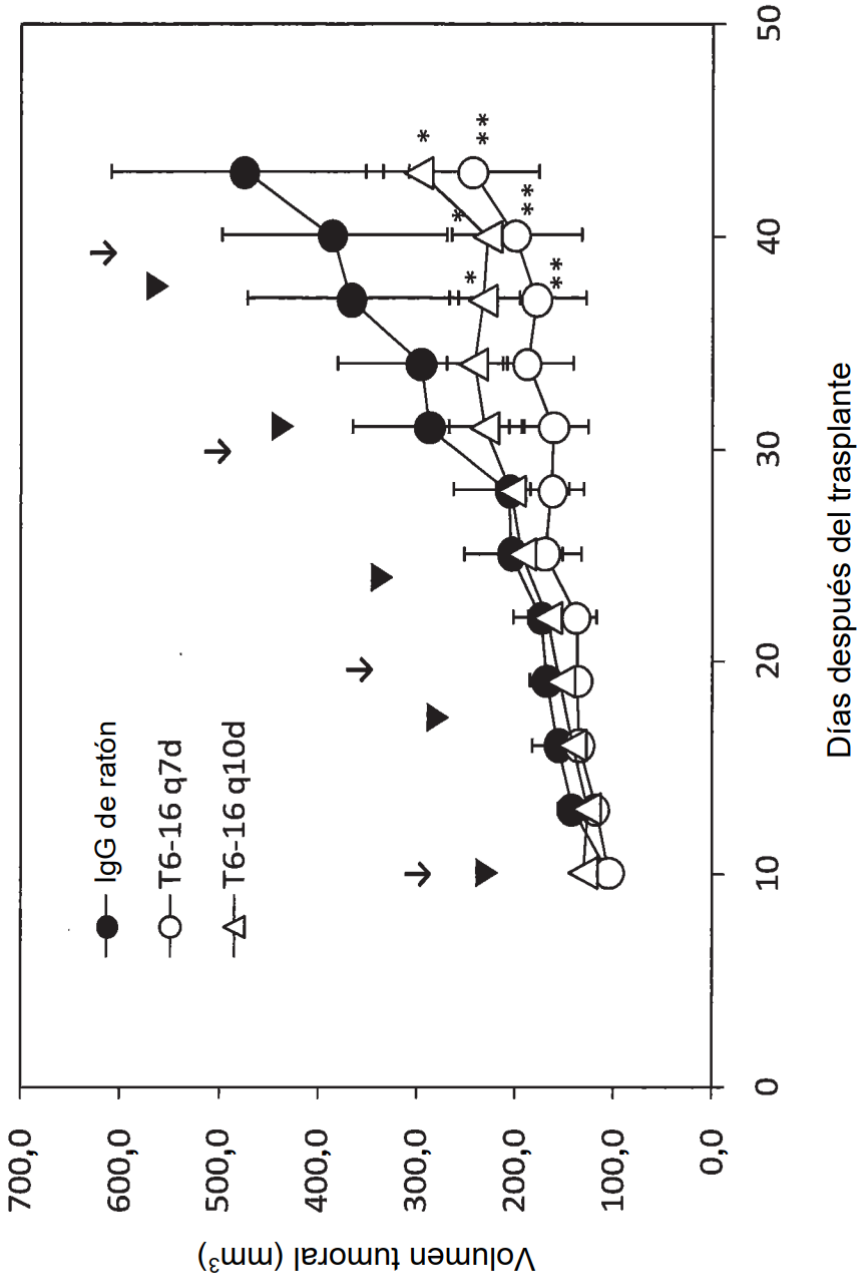

Volumen tumoral (mm³)
700,0
600,0
500,0
400,0
300,0
200,0
100,0
0,0
0
10
20
30
40
50
Días después del trasplante
IgG de ratón
T6-16 q7d
T6-16 q10d
*
**

Fig.30

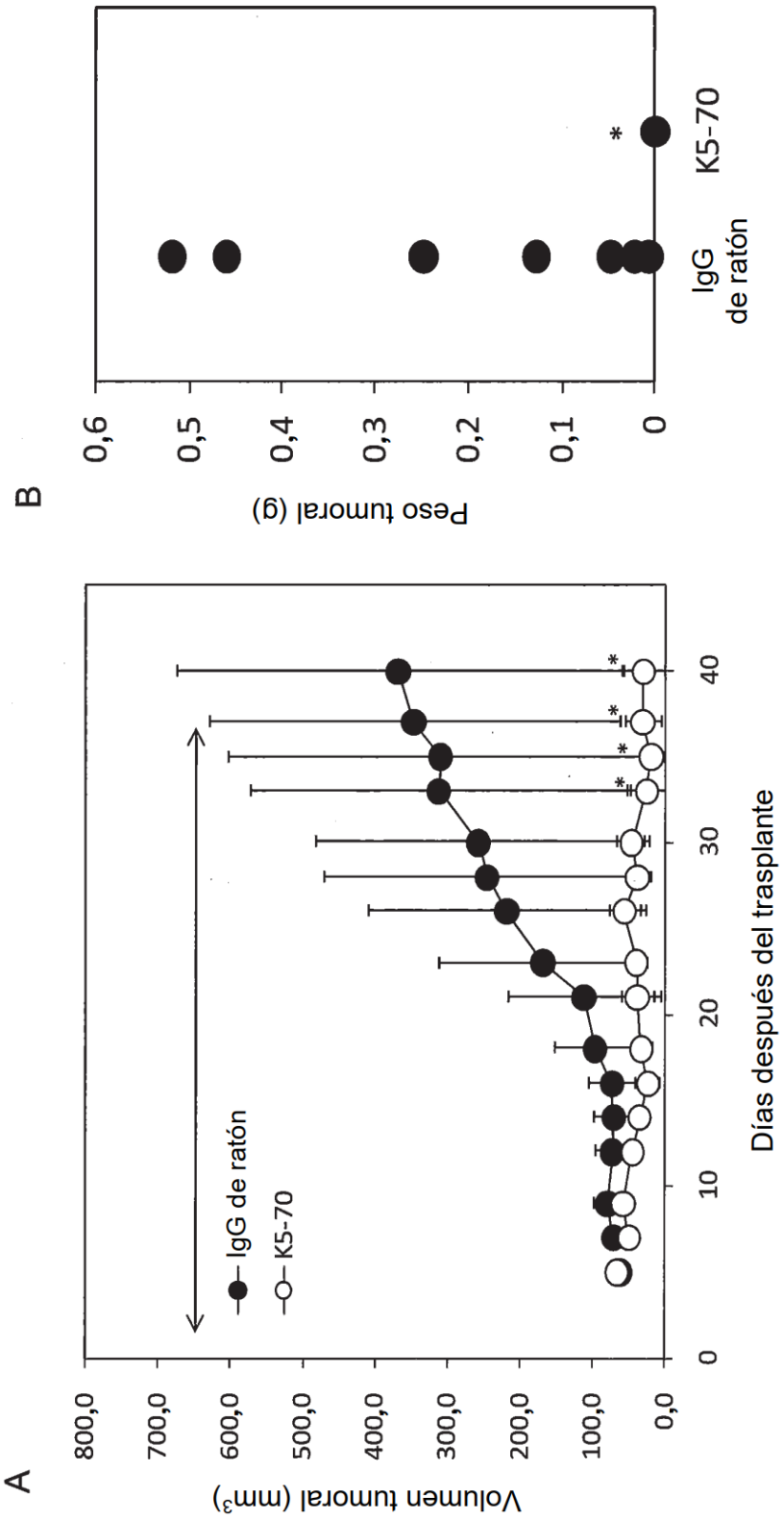

A
Volumen tumoral (mm³)
800,0
700,0
600,0
500,0
400,0
300,0
200,0
100,0
0,0
0
10
20
30
40
Días después del trasplante
IgG de ratón
K5-70
*
B
Peso tumoral (g)
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
IgG de ratón
K5-70
*

Fig.31

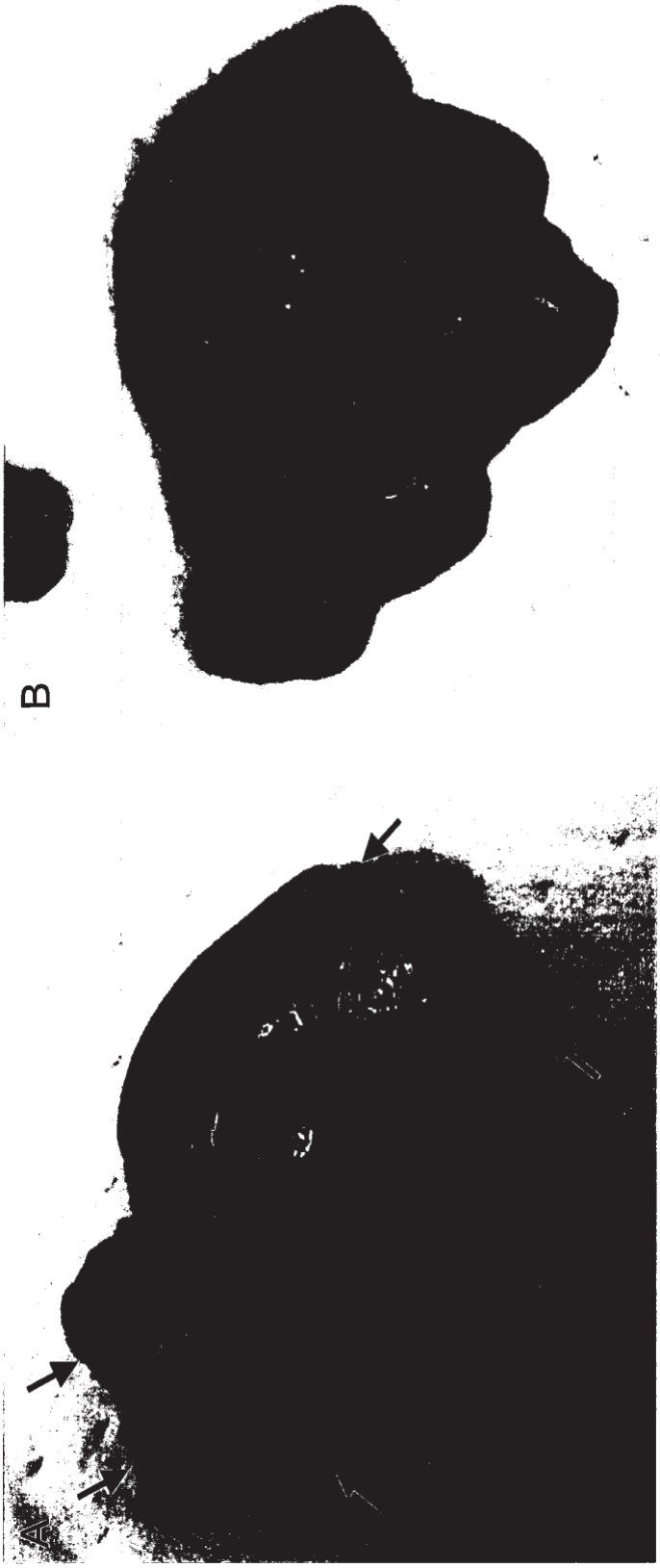


Fig.32

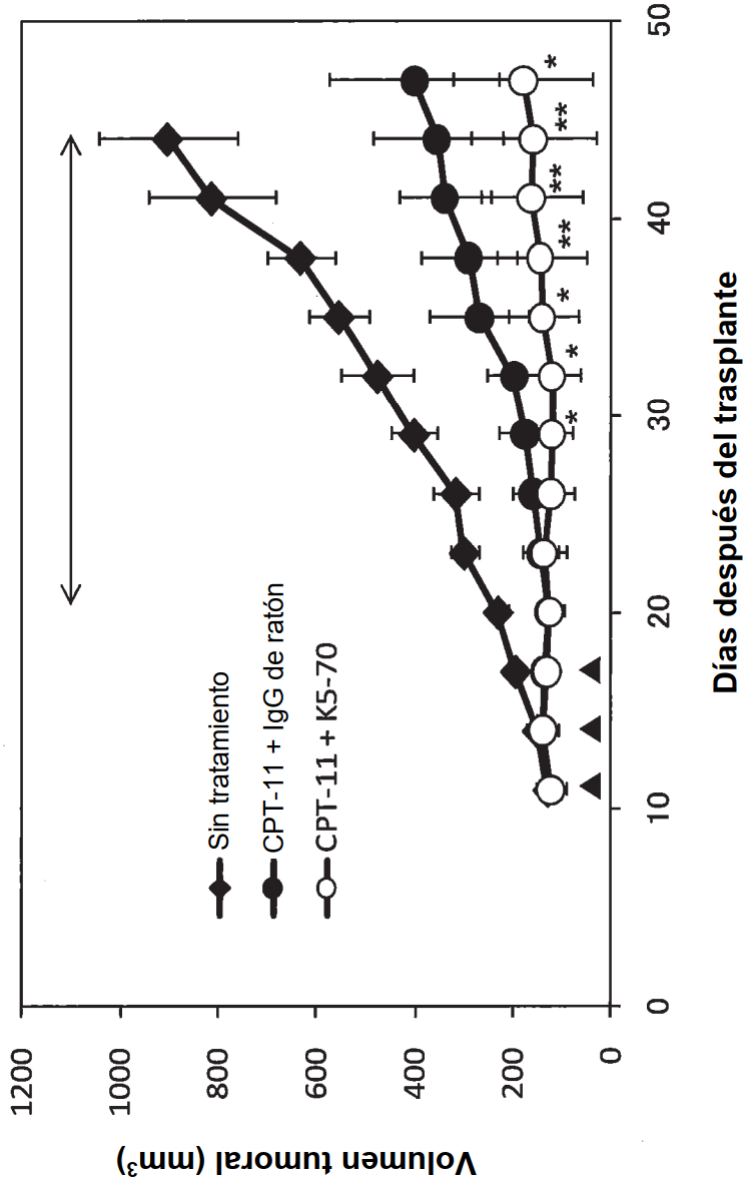

Volumen tumoral (mm³)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
Días después del trasplante
Sin tratamiento
CPT-11 + IgG de ratón
CPT-11 + K5-70
*
**
**
**
*
*
*

Fig.33

K5-70
VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
GTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCATCTACTGGATAAACTGGGTGAAACAGAGGCCT
C K A S G Y T F T I Y W I N W V K Q R P
GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAAT
G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N
CAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
Q K F K D K A T L T V D K S S S T A Y M
CAGCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAACGTCTATG
Q L S S P T S E D S A V Y Y C T R T S M
GCGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
A D Y W G Q G T T L T V S S

Fig.34

K5-70
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAGCATACACTGGTATCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T
AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTCACGTTCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAAATAAAA
G T K L E I K

Fig.35

K5-107
VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
GTCCAACTGCAGCAACCTGGGTCTGAGCTGGTGAGGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G S E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACATTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCAT
C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R H
GGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTTATCCTGGTGGTGGTTATACTAACTACGAT
G Q G L E W I G N I Y P G G G Y T N Y D
GAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATG
E K F K S K G T L T V D T S S S T A Y M
CACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATCATCCGTT
H L S S L T S E D S A V Y Y C T R S S V
TTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
F D Y W G Q G T T L T V S S

Fig.36

K5-107
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACACTGGTTTCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q N I G T S I H W F Q Q R T
AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTCACGTTCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAAATAAAA
G T K L E I K

Fig.37

K5-116-2-1
VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
GTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCT
C K A S G Y T F T S Y W I T W V K Q R P
GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAAT
G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N
CAAAAGTTCAGGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGTACAGCCTACATG
Q K F R D K A T L T V D K S S S T A Y M
CAGCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAGCCCTCTTTGAC
Q L S S P T S E D S A V Y Y C S A L F D
TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
Y W G Q G T T L T V S S

Fig.38

K5-116-2-1
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAGCATACACTGGTATCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T
AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTATTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F I L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTCACGTTCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAAATAAAA
G T K L E I K

Fig.39

T6-16
VH

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGCGTCCACTCTGAG
M G W S W I F L F L L S G T A G V H S E
GTCCAGCTTCAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATTTCC
V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S
TGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTACAATATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATT
C K A S G Y T F T D Y N M H W V K Q S H
GGAAAGAACCTTGAATGGATTGGATATATTTATCCTTACAATGGTGGTACTGGCTACAAC
G K N L E W I G Y I Y P Y N G G T G Y N
CAGAGGTTCAAGAGCAGGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
Q R F K S R A T M T V D K S S S T A Y M
GAGCTCCGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAAGACTAC
E L R S L T S D D S A V Y Y C A R E D Y
GGTAGTAGCCCCTCTTATGCTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCATCGTCTCC
G S S P S Y A M D Y W G Q G T S V I V S
TCA
S

Fig.40

T6-16
VL

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTGAT
M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D
GTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAGGCCTCCATC
V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACGGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTAC
S C R S S Q S L V H G N G N T Y L H W Y
CTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT
L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S
GGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACGGATTTCACACTCAAGATCAGC
G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAACTACACATGTTCCCACG
R V E A E D L G V Y F C S Q T T H V P T
TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA
F G S G T K L E I K

Fig.41

```
                    1         2         3         4
          1234567890 0123456789 0123456789 0123456789
K5-70 VH  QVQLQQPGA ELVRPGASVK LSCKASGYTF TIYWINWVKQ RPGQGLEWIG
HuK5-70 VH QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF TIYWINWVRQ APGQRLEWIG
DA980102 VH QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF T-----WVRQ APGQRLEWMG
          5         6         7         8
          01223456789 0123456789 0123456789 0122223456789
                a                       abc
K5-70 VH  NIYPSDSYTNY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY MQLSSPTSEDSAV
HuK5-70 VH NIYPSDSYTNY NQKFKDKATL TVDTSASTAY MELSSLRSEDTAV
DA980102 VH ----------- ------RVTL TSDTSASTAY MEMSSLRSEDTAV
                    1         1
          9         0         1
          0123456789 0123456789 0123
K5-70 VH  YYCTRTSMA- -DYWGQGTTL TVSS
HuK5-70 VH YYCTRTSMA- -DYWGQGTLV TVSS
DA980102 VH VHYYCAR----- -WGQGTLV TVSS
```

Fig.42

```
                    1         2         3
          1234567890 0123456789 0123456789
K5-70 VL  DILLTQSPA ILSVSPGERV SFSCRASQSI GTSIHWYQQR
HuK5-70 VL EIVLTQSPA TLSLSPGERA TLSCRASQSI GTSIHWYQQK
L41174 VL EIVLTQSPA TLSLSPGERA TLSC------ -----WYQQK
          4         5         6         7
          0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
K5-70 VL  TNGSPRLLIK YASESISGIP SRFSGSGSGT DFTLSINSVE
HuK5-70 VL PGQAPRLLIK YASESISGIP ARFSGSGSGT DFTLTISSLE
L41174 VL PGQAPRLLIY -------GIP ARFSGSGSGT DFTLTISSLE
                              1
          8         9         0
          0123456789 0123456789 01234567
K5-70 VL  SEDIADYYCQ QSNSWPFTFG SGTKLEIK
HuK5-70 VL PEDFAVYYCQ QSNSWPFTFG QGTKVEIK
L41174 VL PEDFAVYYC- ---------FG QGTKVEIK
```

Fig.43

```
                    1         2         3         4
          1234567890 0123456789 0123456789 0123456789
T6-16 VH  EVQLQQSGP ELVKPGASVK ISCKASGYTF TDYNMHWVKQ SHGKNLEWIG
HuT6-16 VH1 QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF TDYNMHWVRQ APGQGLEWIG
HuT6-16 VH2 QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF TDYNMHWVRQ APGQGLEWIG
DA935238 VH QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYTF T-----WVRQ APGQGLEWMG
                    5         6         7         8
          0122345678 9012345678 9012345678 9012222345678 9
                     a                    abc
T6-16 VH  YIYPYNGGTGY NQRFKSRATM TVDKSSSTAY MELRSLTSDDSAV
HuT6-16 VH1 YIYPYNGGTGY NQRFKSRATM TVDKSTSTAY MELRSLRSDDTAV
HuT6-16 VH2 YIYPYNGGTGY NQRFKSRATM TVDTSTSTAY MELRSLRSDDTAV
DA935238 VH ---------- ------RVTM TVDTSTSTAY MELRSLRSDDTAV
                    1         1         1
          9         0         1         1
          0123456789 0000001234567890 0123
                     abcde
T6-16 VH  YYCAREDYGS SPSYAMDYWGQGTSV IVSS
HuT6-16 VH1 YYCAREDYGS SPSYAMDYWGQGTMV TVSS
HuT6-16 VH2 YYCAREDYGS SPSYAMDYWGQGTMV TVSS
DA935238 VH YYCAR----- ---------WGQGTMV TVSS
```

Fig.44

```
                1               2               3
      123456789 0123456789 01234567777777789 0123456789
                                    abcde
T6-16 VL      DVVMTQTPL SLPVSLGDQA SISCRSSQSLVHGNG NTYLHWYLQK
HuT6-16 VL    DIVMTQSPL SLPVTPGEPA SISCRSSQSLVHGNG NTYLHWYLQK
M99608 VL     DIVMTQSPL SLPVTPGEPA SISC---------- -----WYLQK
              4       5       6       7
              0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
T6-16 VL      PGQSPKLLIY KVSNRFSGVP DRFSGSGSGT DFTLKISRVE
HuT6-16 VL    PGQSPQLLIY KVSNRFSGVP DRFSGSGSGT DFTLKISRVE
M99608 VL     PGQSPQLLIY -------GVP DRFSGSGSGT DFTLKISRVE
                                  1
              8       9       0
              01234567890 01234567 01234567
T6-16 VL      AEDLGVYFCS QTTHVP-TFG SGTKLEIK
HuT6-16 VL    AEDVGVYYCS QTTHVP-TFG GGTKVEIK
M99608 VL     AEDVGVYYC----------FG GGTKVEIK
```

Fig.45

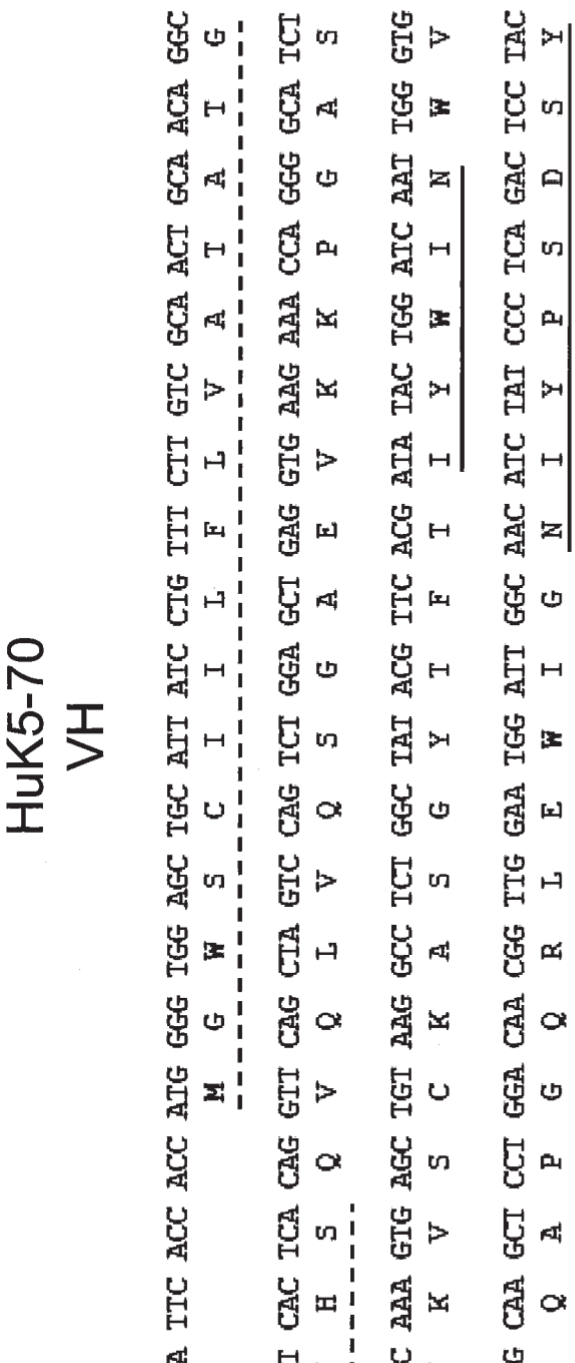

HuK5-70
VH
GAA TTC ACC ACC ATG GGG TGG AGC TGC ATT ATC CTG TTT CTT GTC GCA ACT GCA ACA GGC
M G W S C I I L F L V A T A T G
GTT CAC TCA CAG GTT CAG CTA GTC CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAA CCA GGG GCA TCT
V H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S
GTC AAA GTG AGC TGT AAG GCC TCT GGC TAT ACG TTC ACG ATA TAC TGG ATC AAT TGG GTG
V K V S C K A S G Y T F T I Y W I N W V
AGG CAA GCT CCT GGA CAA CGG TTG GAA TGG ATT GGC AAC ATC TAT CCC TCA GAC TCC TAC
R Q A P G Q R L E W I G N I Y P S D S Y
ACC AAC TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC AAA GCC ACT CTC ACC GTA GAT ACC AGT GCC TCC
T N Y N Q K F K D K A T L T V D T S A S
ACA GCC TAT ATG GAG CTG AGC AGT TTA CGC AGC GAA GAT ACA GCG GTG TAC TAC TGC ACC
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C T
AGA ACC TCC ATG GCT GAC TAT TGG GGT CAG GGT ACA CTG GTG ACT GTG AGC TCC GCT AGC
R T S M A D Y W G Q G T L V T V S S

Fig.46

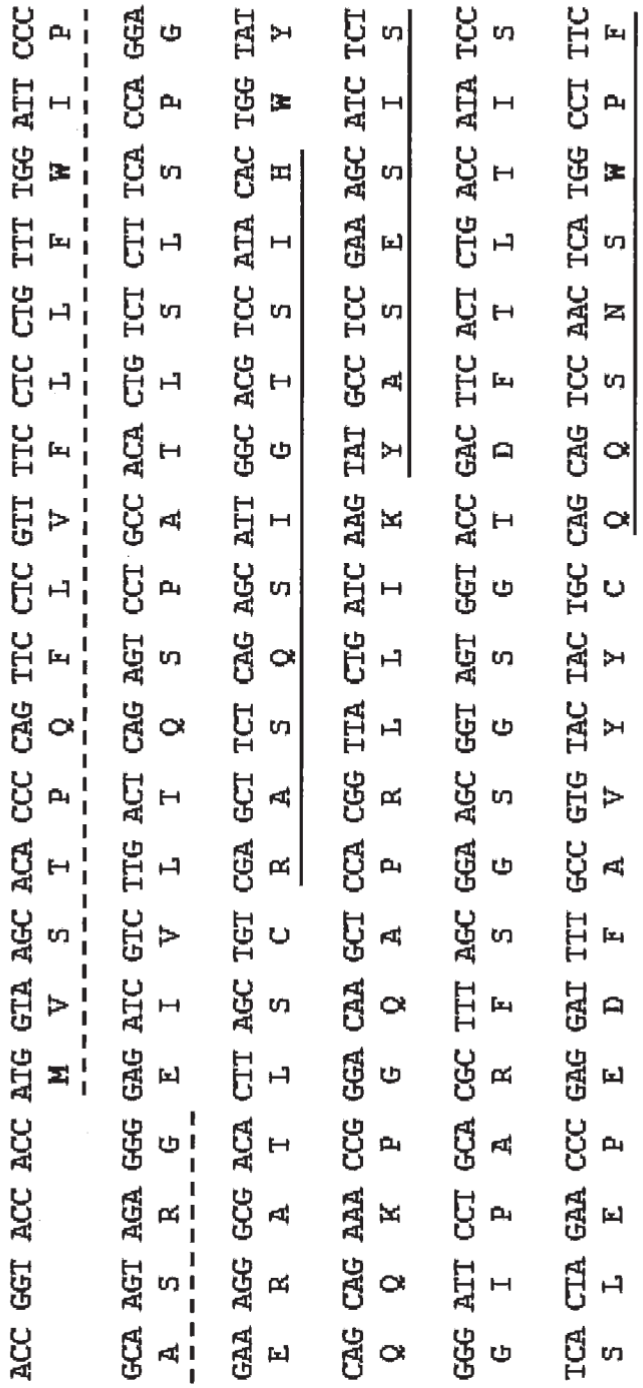

HuK5-70
VL
ACC GGT ACC ACC ATG GTA AGC ACA CCC CAG TTC CTC GTT TTC CTC CTG TTT TGG ATT CCC
M V S T P Q F L V F L L L F W I P
GCA AGT AGA GGG GAG ATC GTC TTG ACT CAG AGT CCT GCC ACA CTG TCT CTT TCA CCA GGA
A S R G E I V L T Q S P A T L S L S P G
GAA AGG GCG ACA CTT AGC TGT CGA GCT TCT CAG AGC ATT GGC ACG TCC ATA CAC TGG TAT
E R A T L S C R A S Q S I G T S I H W Y
CAG CAG AAA CCG GGA CAA GCT CCA CGG TTA CTG ATC AAG TAT GCC TCC GAA AGC ATC TCT
Q Q K P G Q A P R L L I K Y A S E S I S
GGG ATT CCT GCA CGC TTT AGC GGA AGC GGT AGT GGT ACC GAC TTC ACT CTG ACC ATA TCC
G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S
TCA CTA GAA CCC GAG GAT TTT GCC GTG TAC TAC TGC CAG CAG TCC AAC TCA TGG CCT TTC
S L E P E D F A V Y Y C Q Q S N S W P F
ACC TTT GGC CAA GGC ACC AAA GTG GAG ATC AAG CGT ACG
T F G Q G T K V E I K

Fig.47

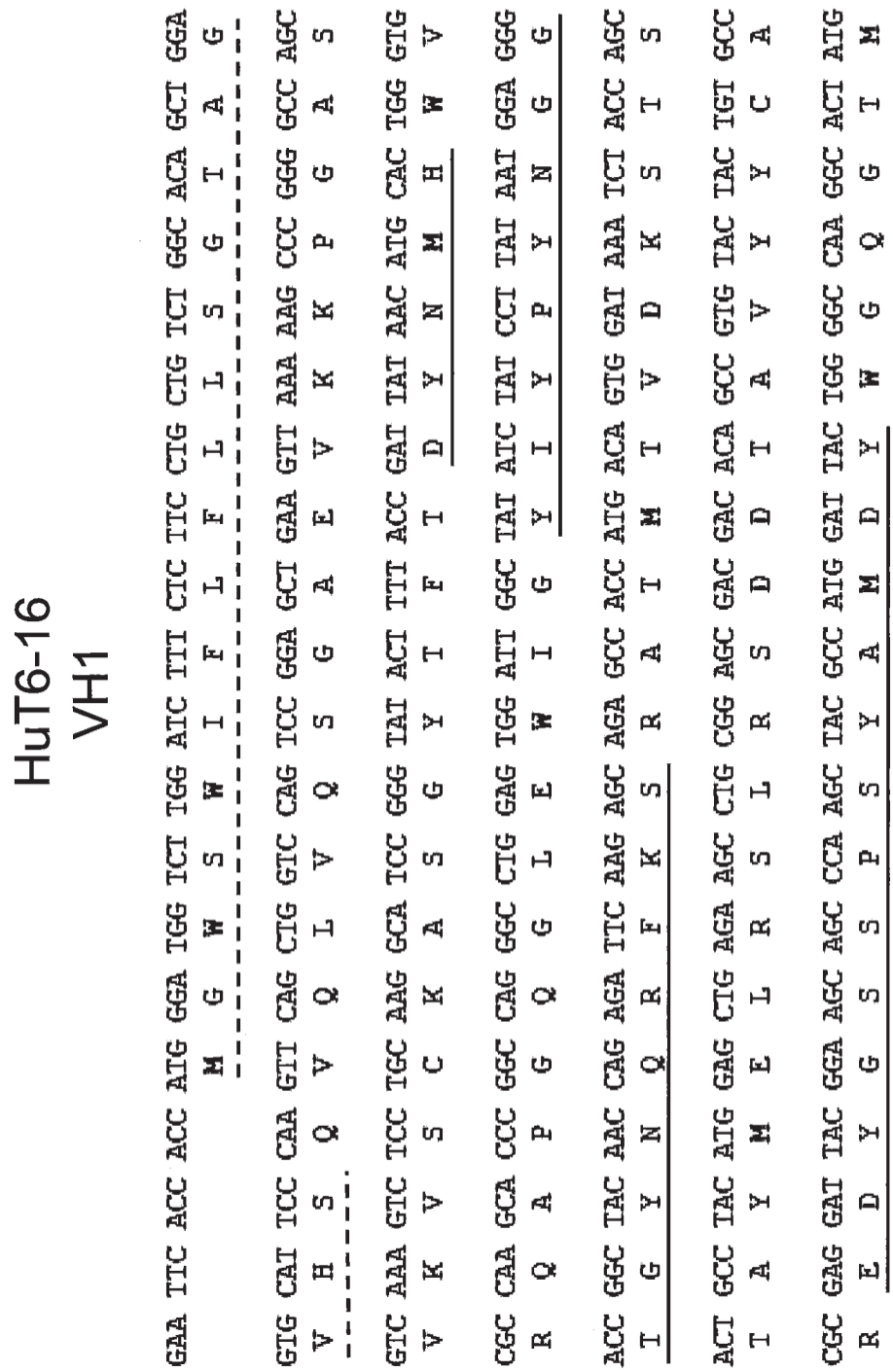


Fig.48

HuT6-16
VH2

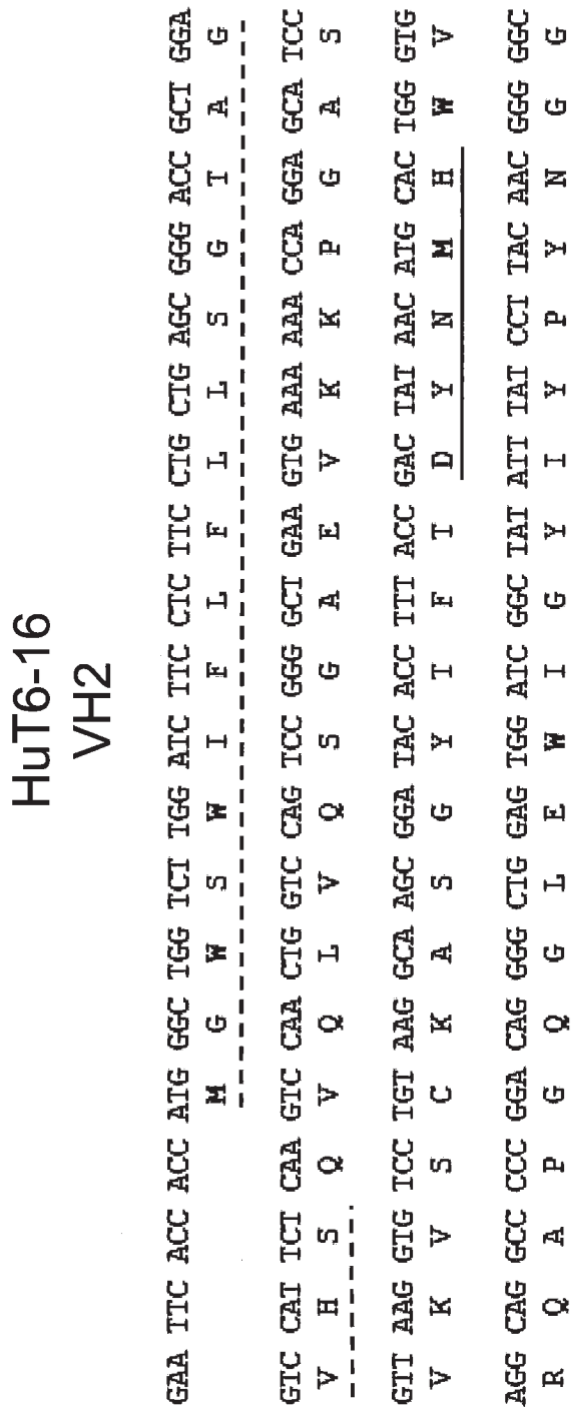


Fig.49

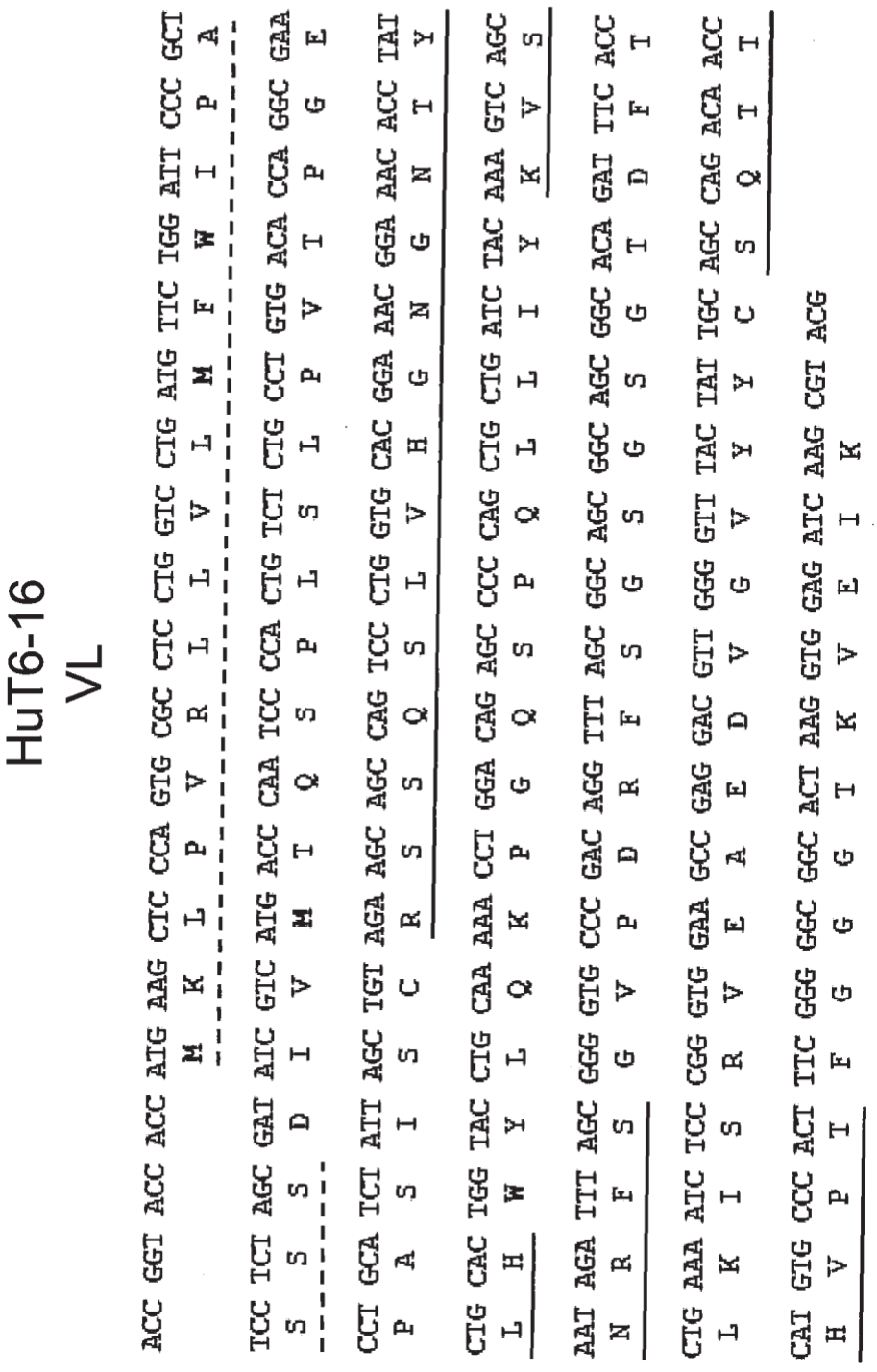

HuT6-16
VL
ACC GGT ACC ACC ATG AAG CTC CCA GTG CGC CTC CTG GTC CTG ATG TTC TGG ATT CCC GCT
M K L P V R L L V L M F W I P A
TCC TCT AGC GAT ATC GTC ATG ACC CAA TCC CCA CTG TCT CTG CCT GTG ACA CCA GGC GAA
S S S D I V M T Q S P L S L P V T P G E
CCT GCA TCT ATT AGC TGT AGA AGC AGC CAG TCC CTG GTG CAC GGA AAC GGA AAC ACC TAT
P A S I S C R S S Q S L V H G N G N T Y
CTG CAC TGG TAC CTG CAA AAA CCT GGA CAG AGC CCC CAG CTG CTG ATC TAC AAA GTC AGC
L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S
AAT AGA TTT AGC GGG GTG CCC GAC AGG TTT AGC GGC AGC GGC AGC GGC ACA GAT TTC ACC
N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T
CTG AAA ATC TCC CGG GTG GAA GCC GAG GAC GTT GGG GTT TAC TAT TGC AGC CAG ACA ACC
L K I S R V E A E D V G V Y Y C S Q T T
CAT GTG CCC ACT TTC GGG GGC GGC ACT AAG GTG GAG ATC AAG CGT ACG
H V P T F G G G T K V E I K

Fig.50

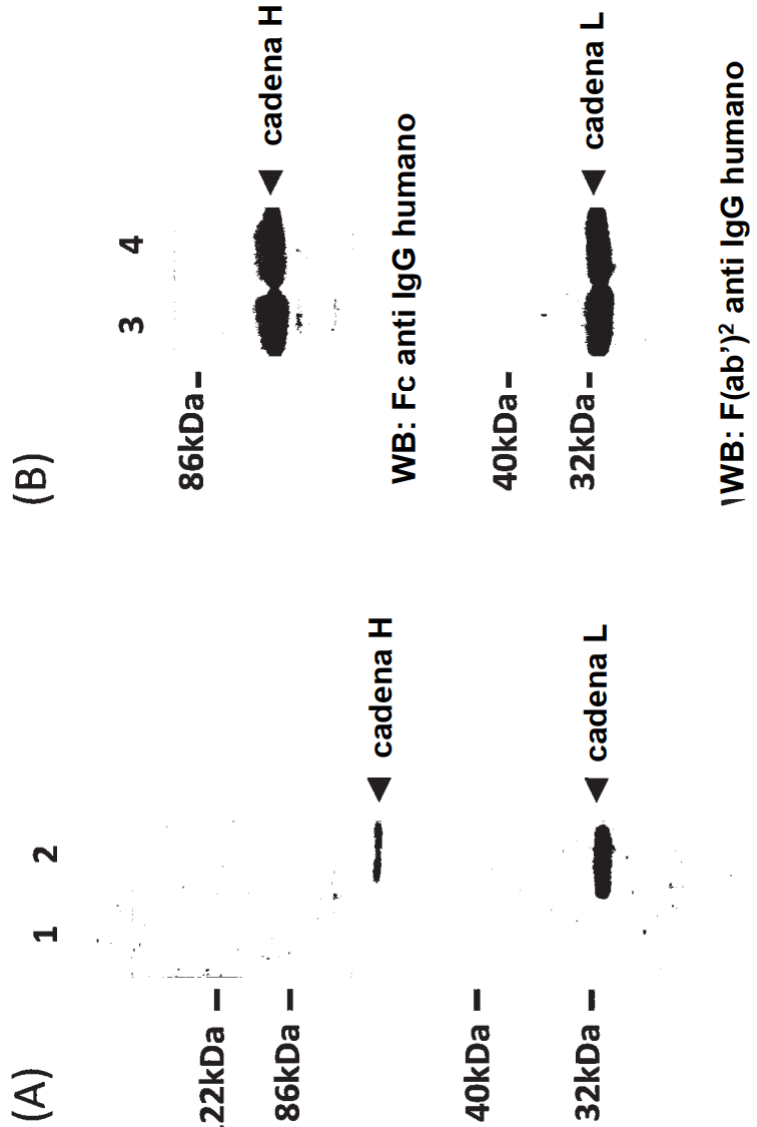

(A)
1
2
122kDa
86kDa
cadena H
40kDa
32kDa
cadena L
WB: anti Ig humana-HRP
(B)
3
4
86kDa
cadena H
WB: Fc anti IgG humano
40kDa
32kDa
cadena L
WB: F(ab')2 anti IgG humano

Fig.51

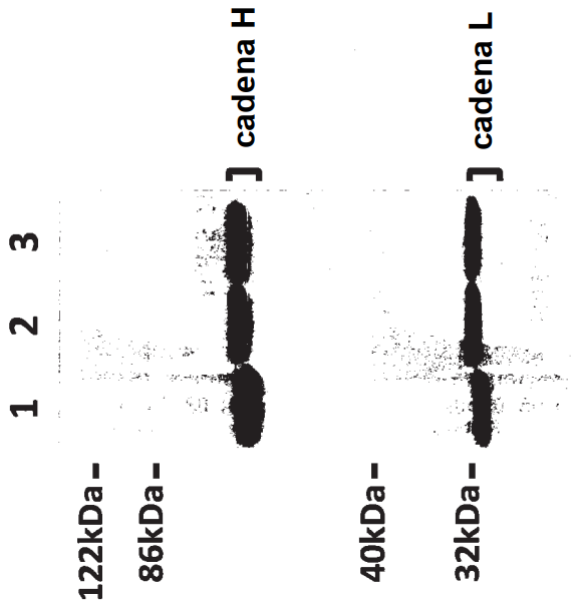


Fig. 52

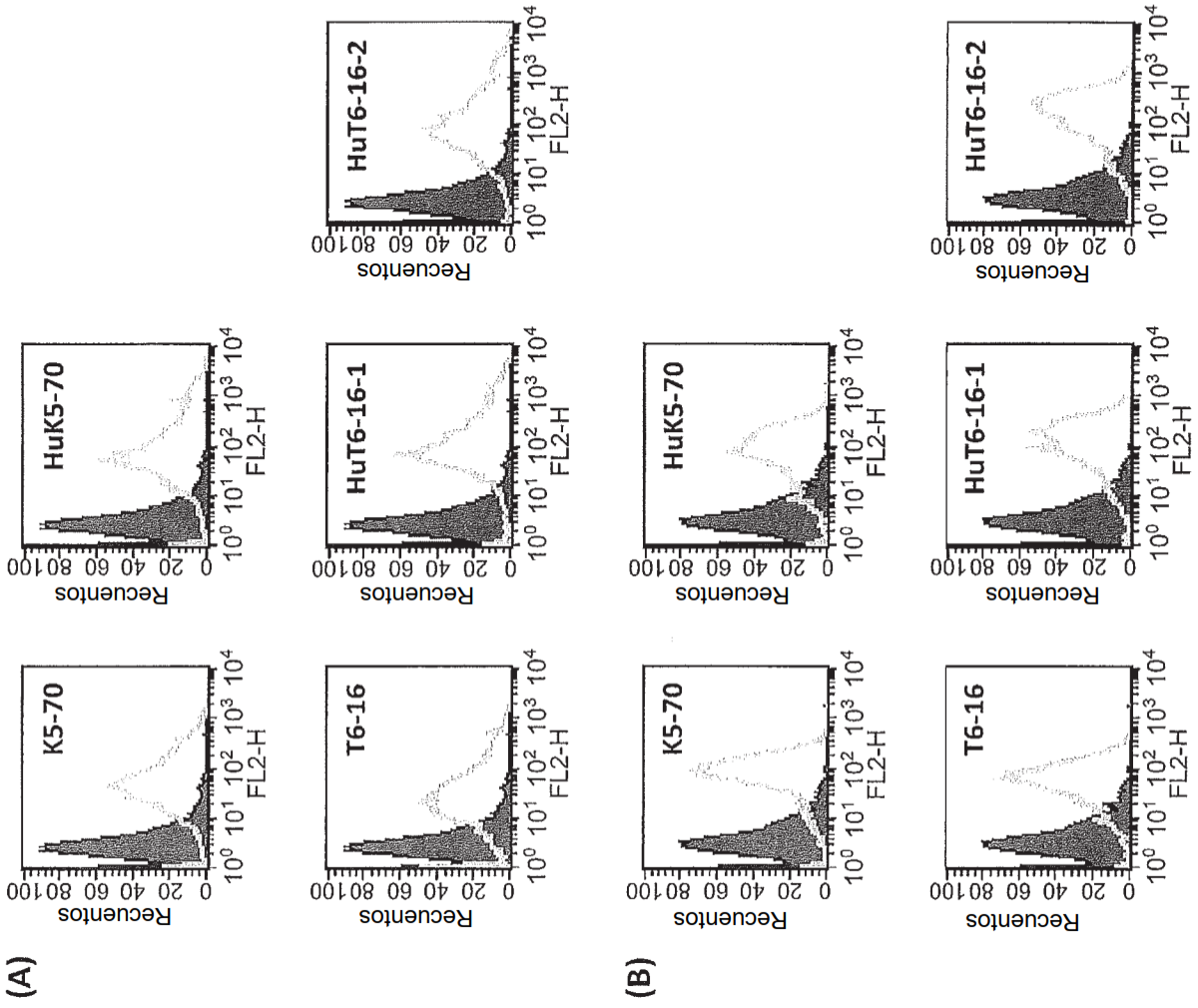


Fig.53

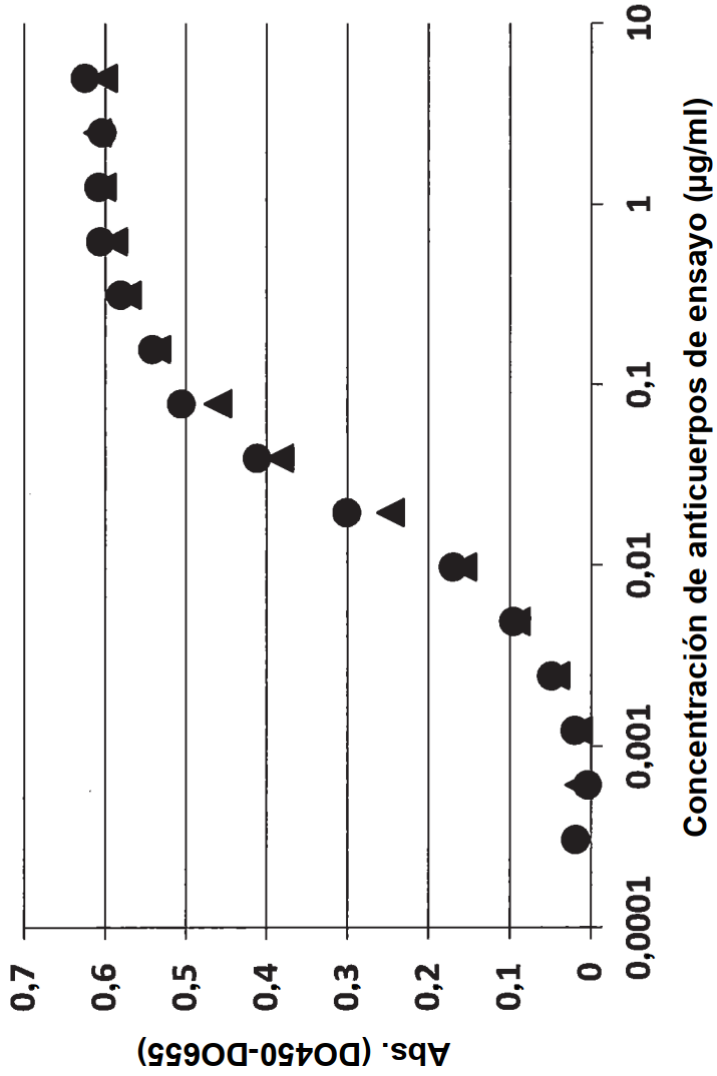

Abs. (DO450-DO655)
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Concentración de anticuerpos de ensayo (µg/ml)

Fig.54

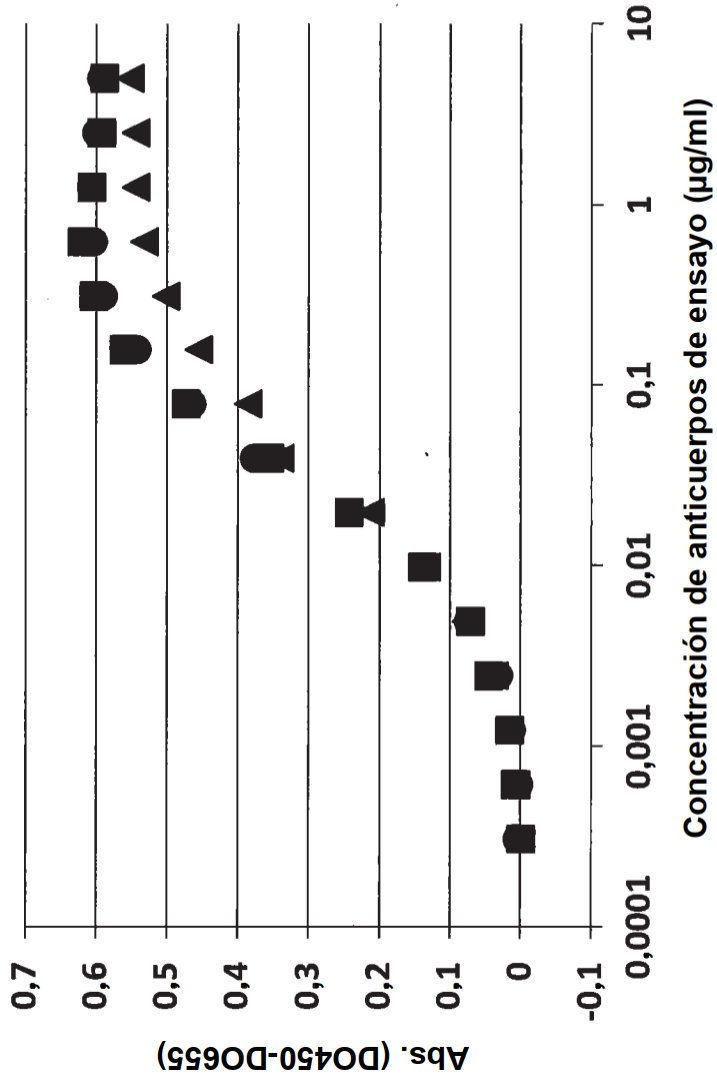

Abs. (DO450-DO655)
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
-0,1
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Concentración de anticuerpos de ensayo (µg/ml)

Fig.55

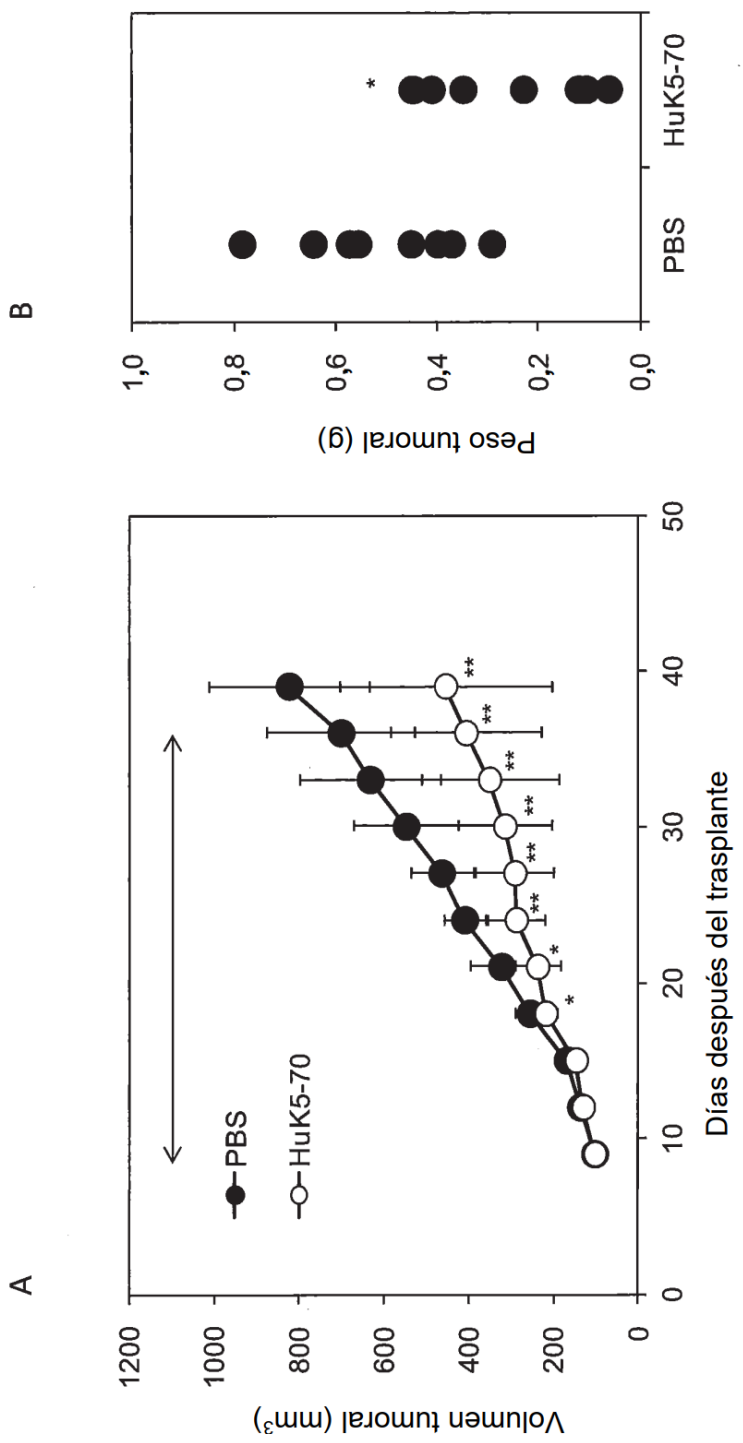

A
Volumen tumoral (mm³)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
Días después del trasplante
PBS
HuK5-70
B
Peso tumoral (g)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
PBS
HuK5-70

Fig.56

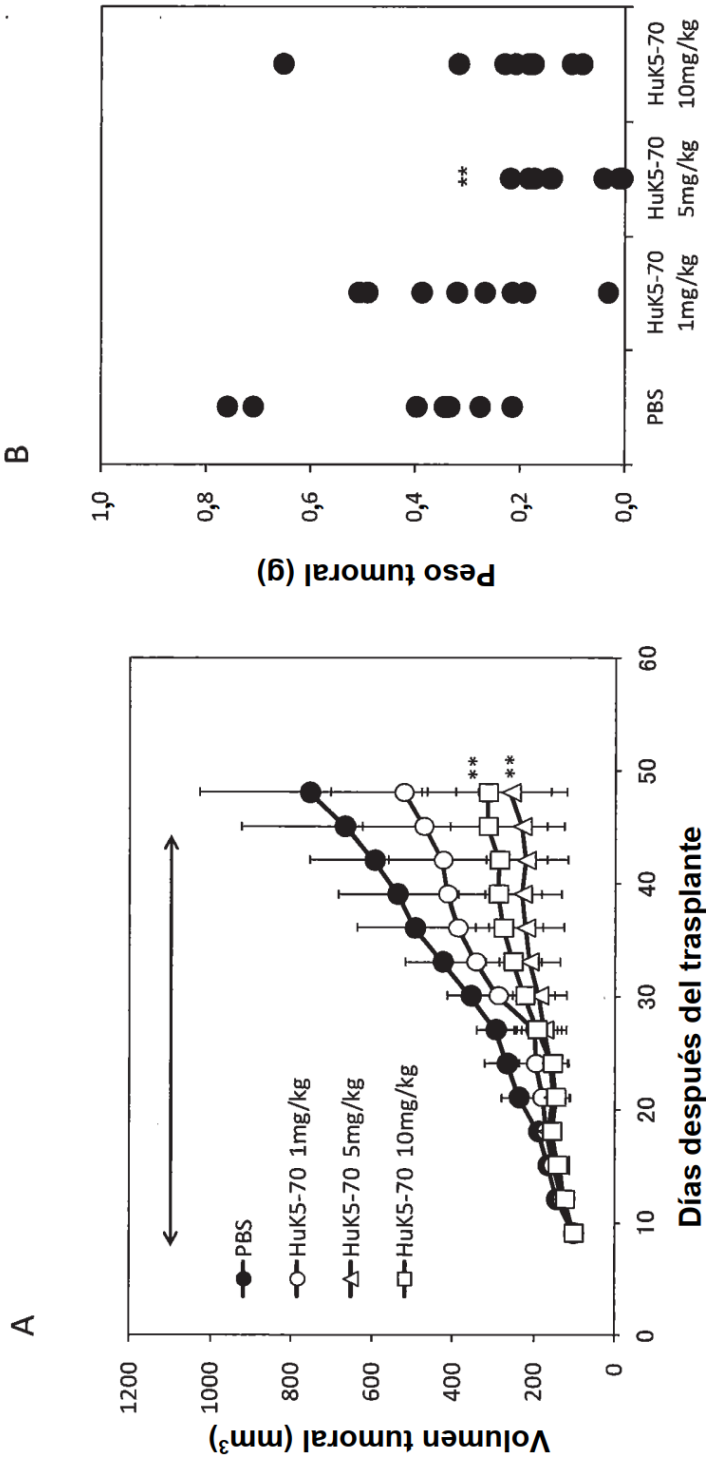

A
Volumen tumoral (mm³)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
60
Días después del trasplante
PBS
HuK5-70 1mg/kg
HuK5-70 5mg/kg
HuK5-70 10mg/kg
**
**
B
Peso tumoral (g)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
PBS
HuK5-70 1mg/kg
HuK5-70 5mg/kg
HuK5-70 10mg/kg
**

Fig.57

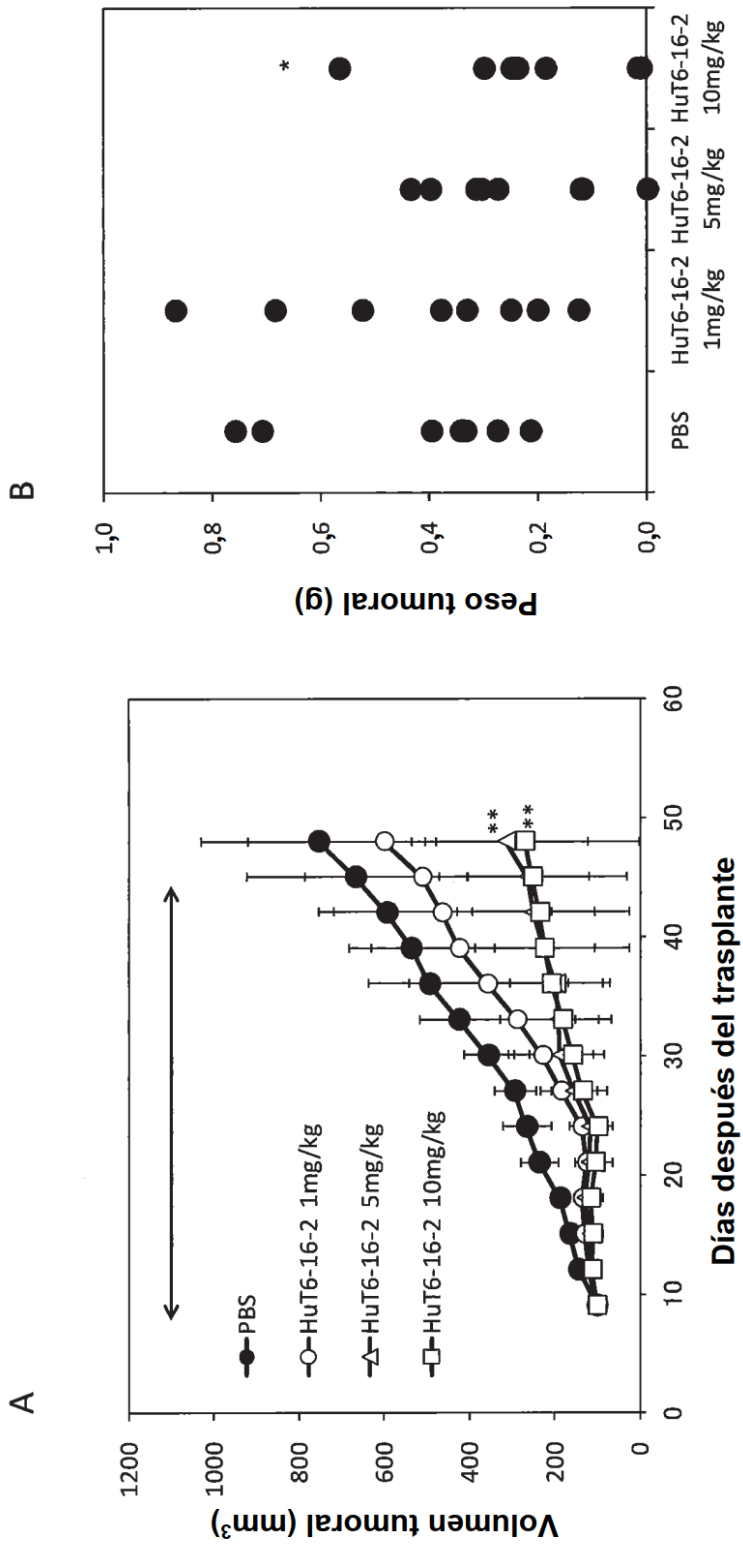

A
Volumen tumoral (mm³)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
60
Días después del trasplante
PBS
HuT6-16-2 1mg/kg
HuT6-16-2 5mg/kg
HuT6-16-2 10mg/kg
**
**
B
Peso tumoral (g)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
*
PBS
HuT6-16-2 1mg/kg
HuT6-16-2 5mg/kg
HuT6-16-2 10mg/kg

Fig.58

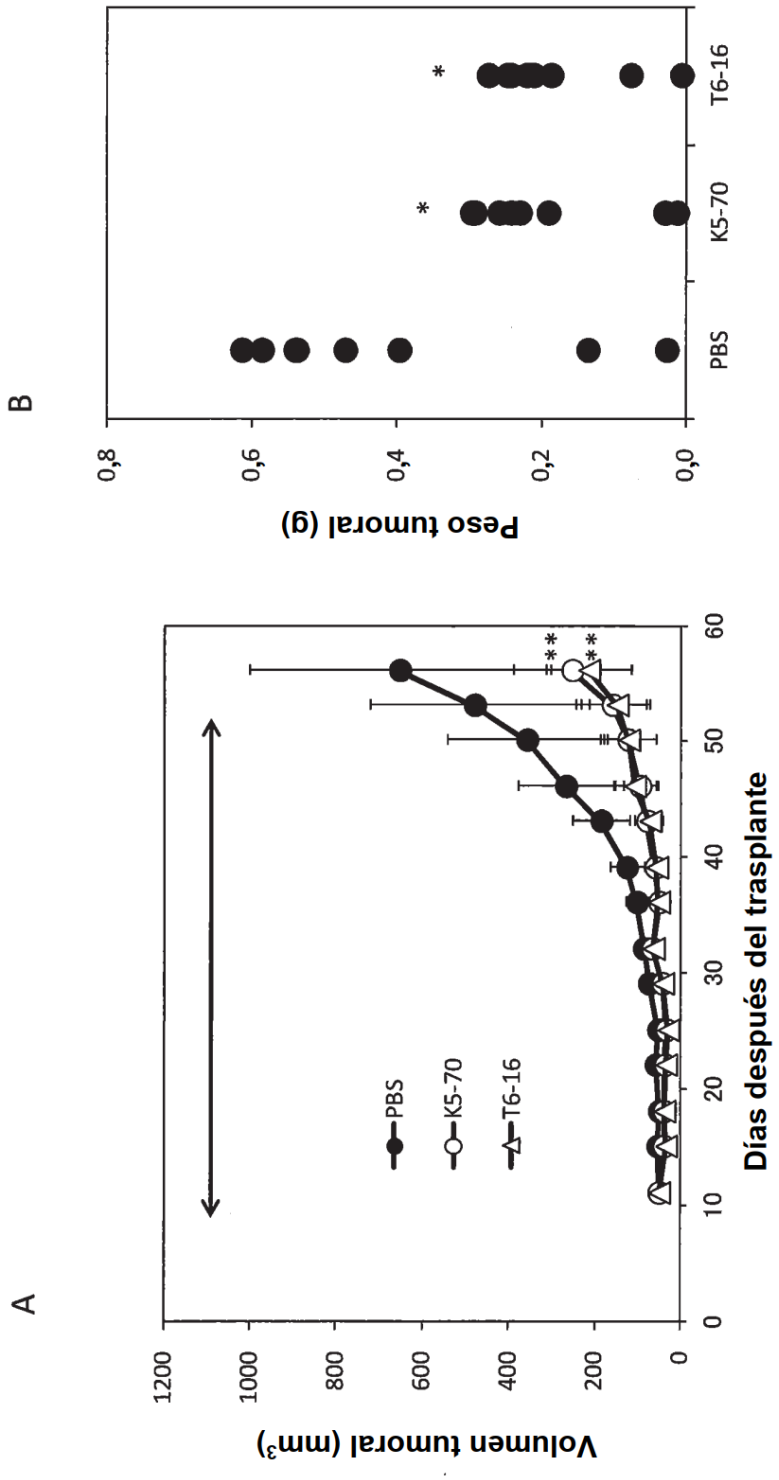

A
Volumen tumoral (mm³)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
60
Días después del trasplante
PBS
K5-70
T6-16
**
**
B
Peso tumoral (g)
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
*
*
PBS
K5-70
T6-16

Fig.59

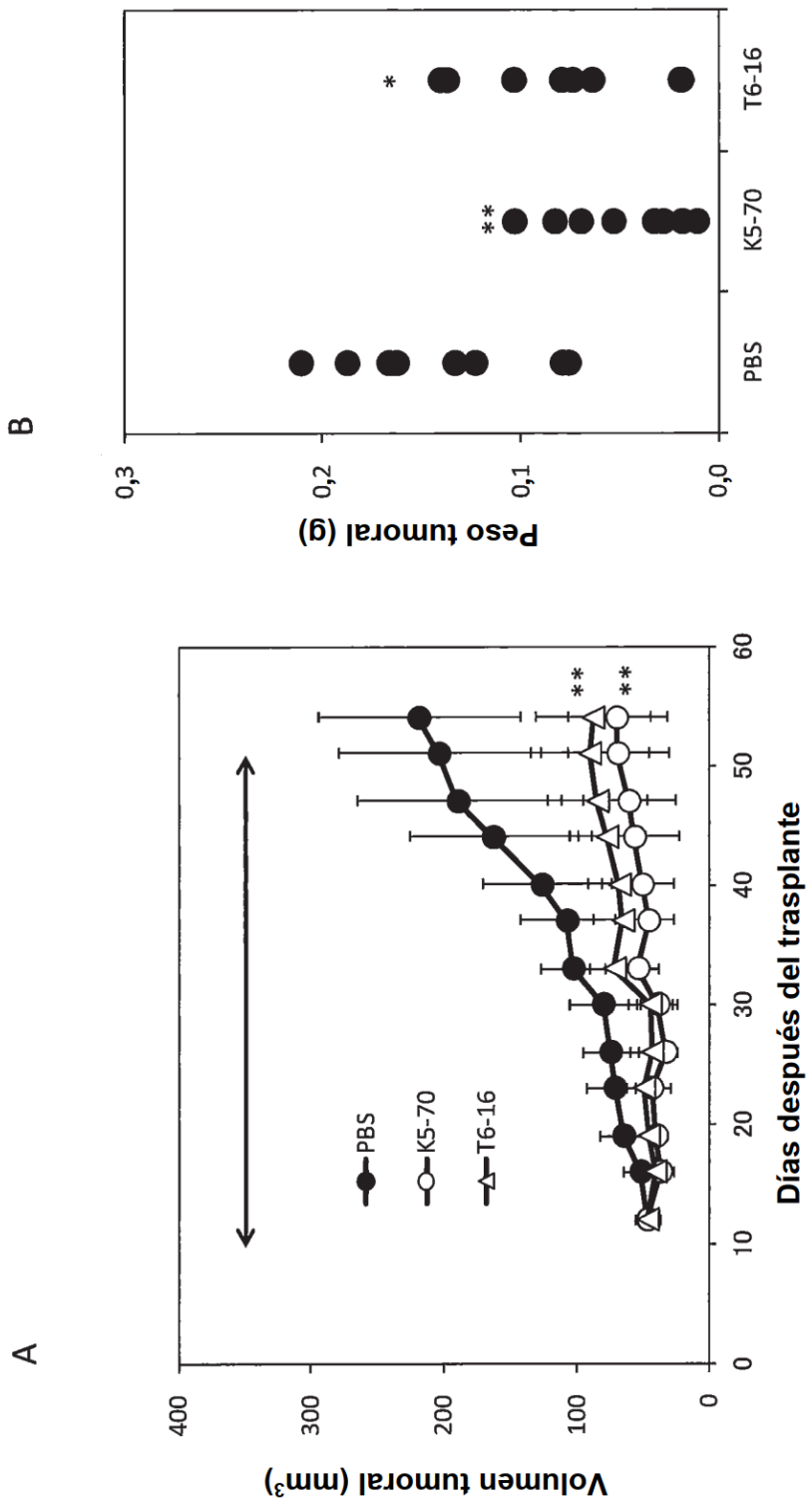

A
Volumen tumoral (mm³)
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
60
Días después del trasplante
PBS
K5-70
T6-16
**
**
B
Peso tumoral (g)
0,3
0,2
0,1
0,0
PBS
K5-70
T6-16
*
**

Fig.60

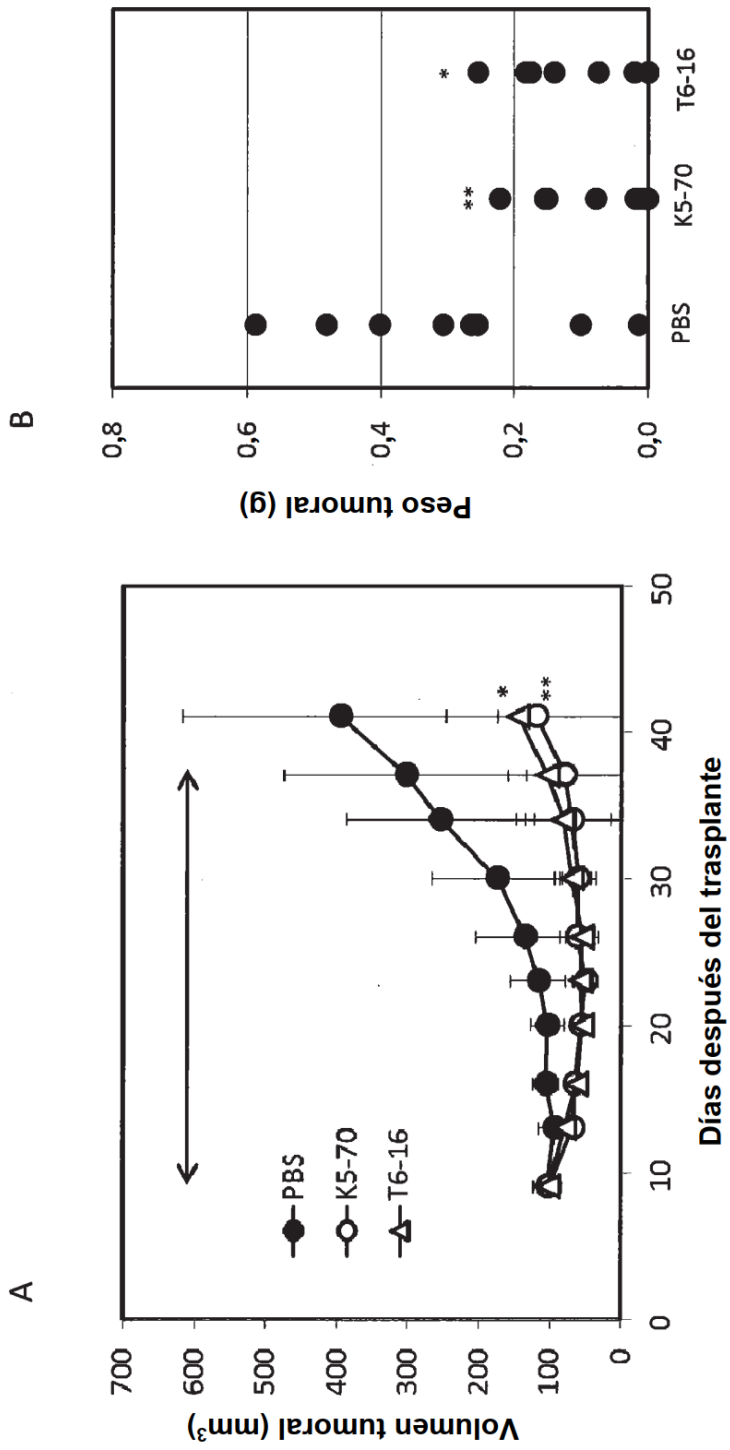

A
B
Volumen tumoral (mm³)
Días después del trasplante
PBS
K5-70
T6-16
Peso tumoral (g)
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
*
**

Fig.61

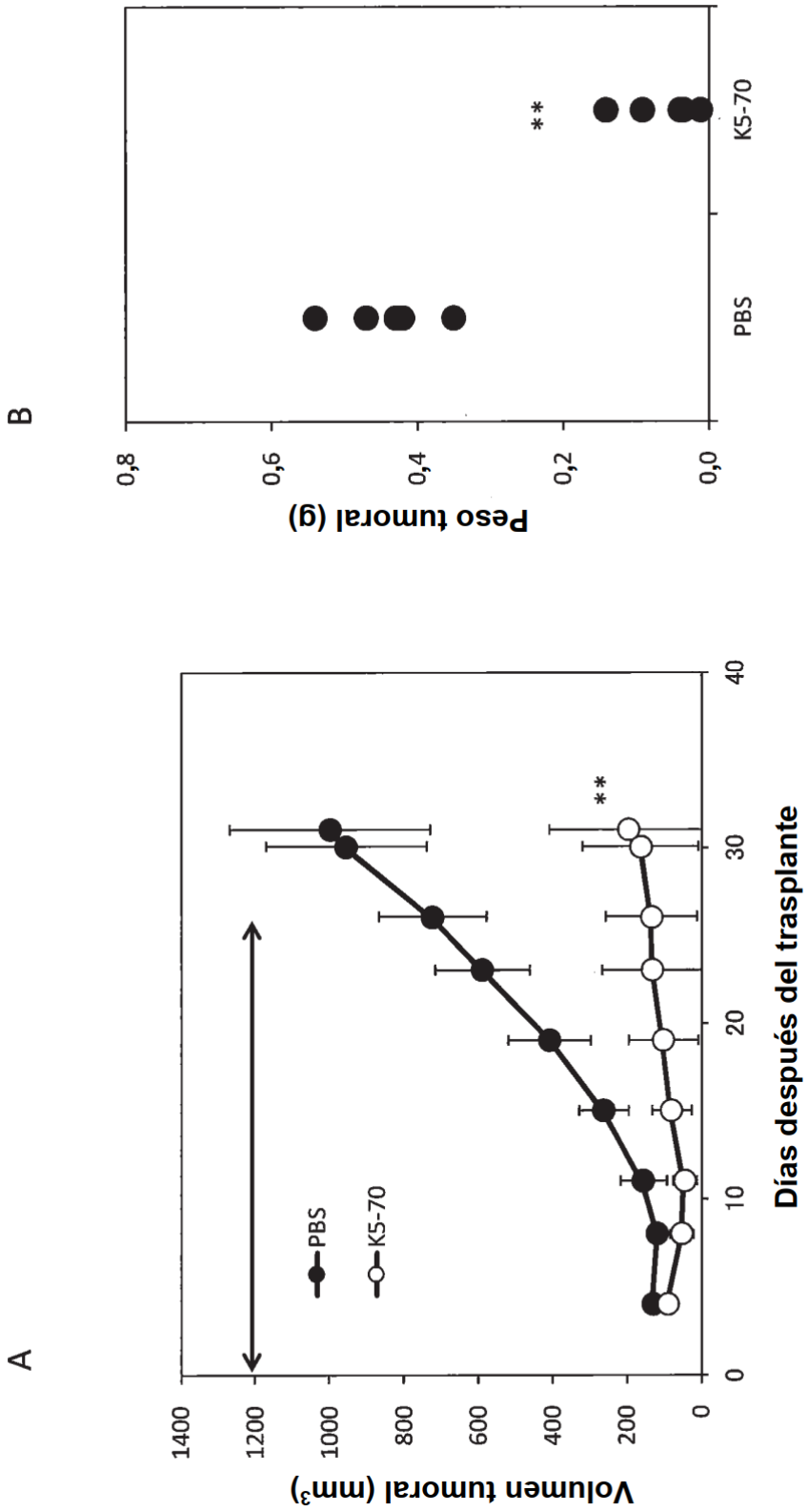

A
Volumen tumoral (mm³)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
Días después del trasplante
PBS
K5-70
**
B
Peso tumoral (g)
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
PBS
K5-70
**

Fig.62

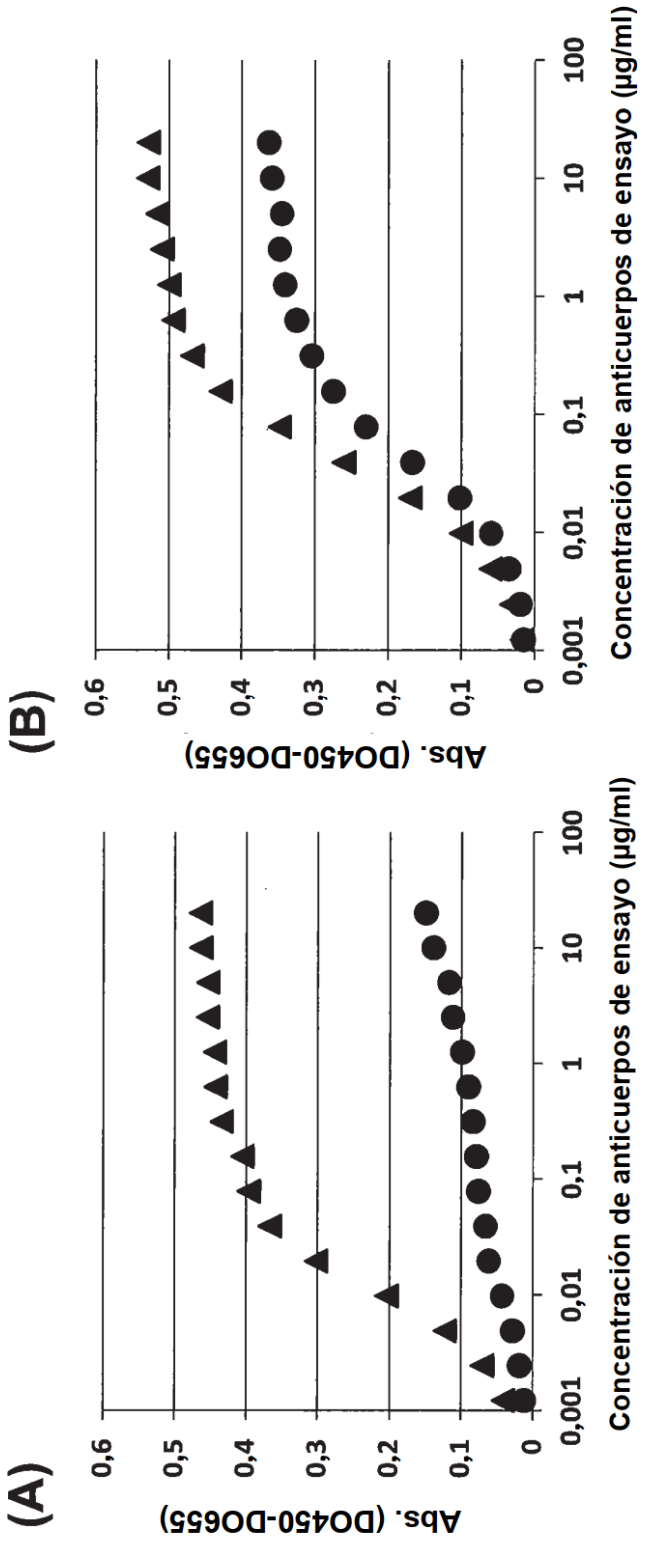

(A)
Abs. (DO450-DO655)
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Concentración de anticuerpos de ensayo (µg/ml)
(B)
Abs. (DO450-DO655)
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Concentración de anticuerpos de ensayo (µg/ml)

Fig.63

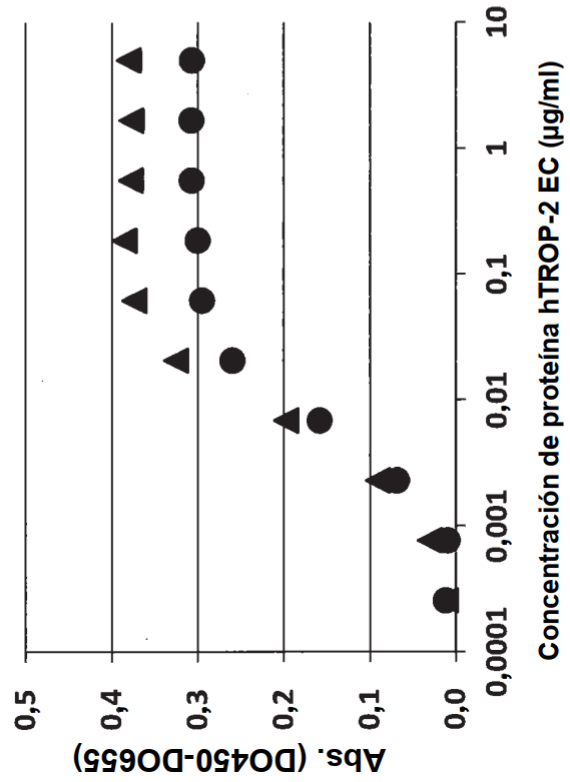

Abs. (DO450-DO655)
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Concentración de proteína hTROP-2 EC (µg/ml)

Fig.64

```
 EcoRI    Kozak
GAA TTC  ACC ACC  ATG GGA TGG TCC TGC ATT ATT CTC CTC TTT CTC GTC GCC ACC GCC ACA GGC
                   M   G   W   S   C   I   I   L   L   F   L   V   A   T   A   T   G

GTG CAC AGC CAG GTT CAA CTG CAG CAA CCT GGG GCA GAG CTG GTT CGG CCA GGG GCC TCC
 V   H   S   Q   V   Q   L   Q   Q   P   G   A   E   L   V   R   P   G   A   S

GTC AAA CTG TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC ACT TTC ACC ATC TAC TGG ATC AAC TGG GTG
 V   K   L   S   C   K   A   S   G   Y   T   F   T   I   Y   W   I   N   W   V

AAG CAG AGG CCC GGC CAG GGC CTG GAA TGG ATC GGA AAT ATC TAT CCT AGC GAT TCT TAC
 K   Q   R   P   G   Q   G   L   E   W   I   G   N   I   Y   P   S   D   S   Y

ACA AAT TAC AAC CAG AAG TTC AAG GAC AAG GCT ACC CTG ACC GTG GAC AAA TCT AGC TCC
 T   N   Y   N   Q   K   F   K   D   K   A   T   L   T   V   D   K   S   S   S

ACA GCC TAC ATG CAG CTG AGC AGC CCC ACT AGC GAG GAT AGC GCA GTG TAT TAT TGT ACC
 T   A   Y   M   Q   L   S   S   P   T   S   E   D   S   A   V   Y   Y   C   T

                                                                    NheI
AGA ACC AGC ATG GCC GAC TAT TGG GGA CAG GGC ACA ACT CTG ACC GTG AGC AGC GCT AGC
 R   T   S   M   A   D   Y   W   G   Q   G   T   T   L   T   V   S   S
```

Fig.65

```
 AgeI     Kozak
ACC GGT  ACC ACC  ATG GTT AGC ACA CCT CAA TTT CTG GTC TTC CTG CTC TTC TGG ATT CCT
                  M  V  S  T  P  Q  F  L  V  F  L  L  F  W  I  P

GCC AGC AGA GGA GAT ATC CTC CTG ACA CAA AGC CCC GCA ATC CTG AGC GTG TCC CCC GGA
 A  S  R  G  D  I  L  L  T  Q  S  P  A  I  L  S  V  S  P  G

GAG CGC GTG AGC TTT AGC TGC CGG GCC AGC CAG AGC ATT GGA ACC AGC ATC CAC TGG TAT
 E  R  V  S  F  S  C  R  A  S  Q  S  I  G  T  S  I  H  W  Y

CAG CAG AGA ACC AAC GGG TCT CCC AGG CTG CTG ATT AAA TAC GCT TCT GAG TCT ATT TCC
 Q  Q  R  T  N  G  S  P  R  L  L  I  K  Y  A  S  E  S  I  S

GGG ATC CCA AGC AGA TTC TCC GGC TCT GGC AGC GGC ACT GAT TTT ACT CTG TCT ATC AAC
 G  I  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  S  I  N

AGC GTG GAG TCC GAA GAC ATC GCC GAC TAC TAT TGT CAG CAG AGC AAT TCC TGG CCA TTC
 S  V  E  S  E  D  I  A  D  Y  Y  C  Q  Q  S  N  S  W  P  F

                                                BsiWI
ACC TTT GGC AGC GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAG CGT ACG
 T  F  G  S  G  T  K  L  E  I  K
```

Fig.66

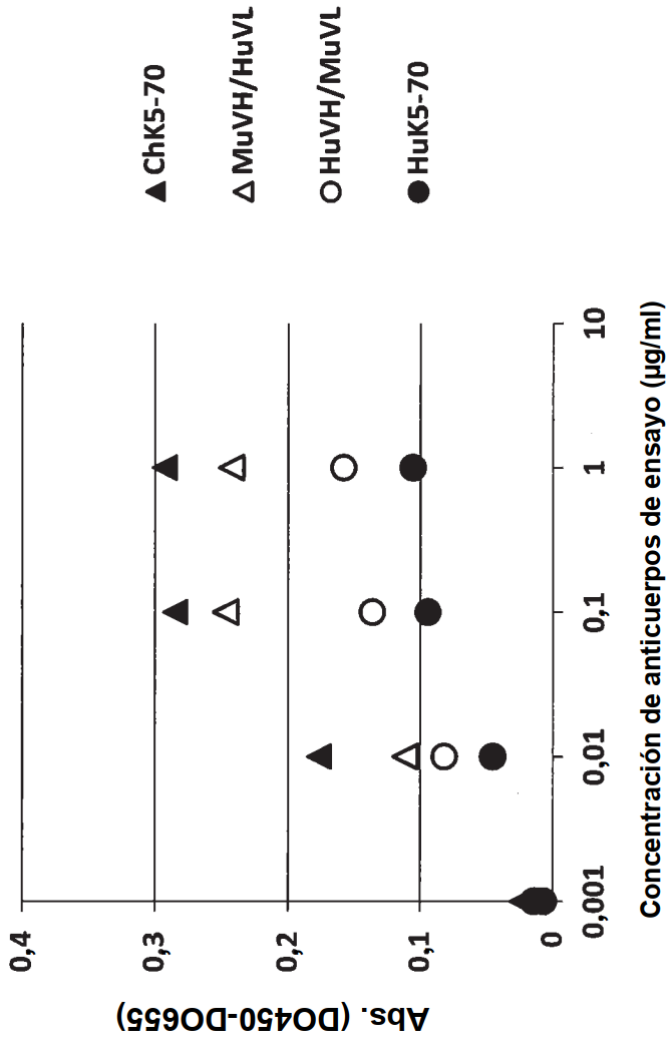

▲ChK5-70
△MuVH/HuVL
○HuVH/MuVL
●HuK5-70
Abs. (DO450-DO655)
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Concentración de anticuerpos de ensayo (µg/ml)

Fig.67

	123456789	1 0123456789	2 0123456789	3 0123456789	4 0123456789	5 01223456789 a
HuK5-70 VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	TIYWINWVRQ	APGQRLEWIG	NIYPSDSYTNY
V5Q	----Q----	----------	----------	----------	----------	----------
S7P	------P--	----------	----------	----------	----------	----------
V11L	---------	-L--------	----------	----------	----------	----------
K12V	---------	--V-------	----------	----------	----------	----------
K13R	---------	---R------	----------	----------	----------	----------
V20L	---------	----------	L---------	----------	----------	----------
R38K	---------	----------	----------	--------K-	----------	----------
A40R	---------	----------	----------	----------	R---------	----------
R44G	---------	----------	----------	----------	----G-----	----------
T73K	---------	----------	----------	----------	----------	----------
A75S	---------	----------	----------	----------	----------	----------
E81Q	---------	----------	----------	----------	----------	----------
L82cP	---------	----------	----------	----------	----------	----------
R83T	---------	----------	----------	----------	----------	----------
T87S	---------	----------	----------	----------	----------	----------
L108T	---------	----------	----------	----------	----------	----------
V109L	---------	----------	----------	----------	----------	----------
V11L/R38K	---------	-L--------	----------	--------K-	----------	----------

	6 0123456789	7 0123456789 abc	8 0122223456789	9 0123456789	10 0123456789	11 0123
HuK5-70 VH	NQKFKDKATL	TVDTSASTAY	MELSSLRSEDTAV	YYCTRTSMA-	-DYWGQGTLV	TVSS
V5Q	----------	----------	----------	----------	----------	----
S7P	----------	----------	----------	----------	----------	----
V11L	----------	----------	----------	----------	----------	----
K12V	----------	----------	----------	----------	----------	----
K13R	----------	----------	----------	----------	----------	----
V20L	----------	----------	----------	----------	----------	----
R38K	----------	----------	----------	----------	----------	----
A40R	----------	----------	----------	----------	----------	----
R44G	----------	----------	----------	----------	----------	----
T73K	----------	---K------	----------	----------	----------	----
A75S	----------	-----S----	----------	----------	----------	----
E81Q	----------	----------	-Q----------	----------	----------	----
L82cP	----------	----------	-----P------	----------	----------	----
R83T	----------	----------	------T-----	----------	----------	----
T87S	----------	----------	----------S--	----------	----------	----
L108T	----------	----------	----------	----------	--------T-	----
V109L	----------	----------	----------	----------	---------L	----
V11L/R38K	----------	----------	----------	----------	----------	----

Fig.68

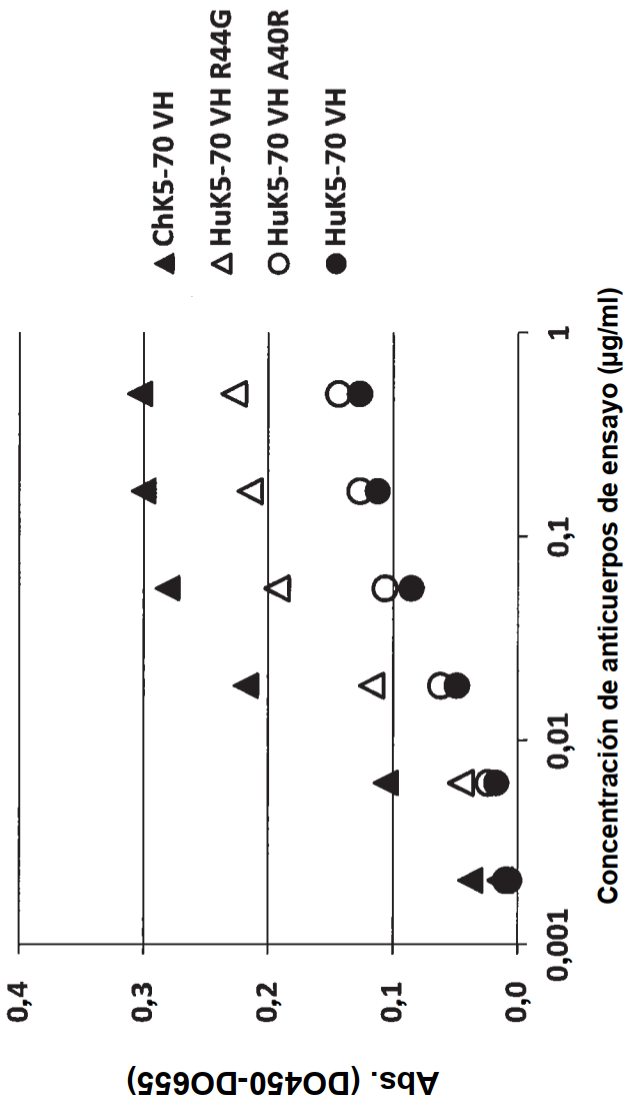

▲ ChK5-70 VH
△ HuK5-70 VH R44G
○ HuK5-70 VH A40R
● HuK5-70 VH
Abs. (DO450-DO655)
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,001
0,01
0,1
1
Concentración de anticuerpos de ensayo (µg/ml)

Fig.69

```
  EcoRI   Kozak
GAA TTC ACC ACC ATG GGC TGG AGC TGT ATT ATT CTC TTC CTC GTC GCC ACT GCA ACC GGG
                M   G   W   S   C   I   I   L   F   L   V   A   T   A   T   G

GTC CAC TCC CAG GTC CAG CTG GTG CAG AGC GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCC GGC GCC AGC
 V   H   S   Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G   A   S
             ≡

GTT AAG GTT TCT TGC AAA GCC TCT GGC TAT ACA TTC ACA ATC TAT TGG ATC AAT TGG GTG
 V   K   V   S   C   K   A   S   G   Y   T   F   T   I   Y   W   I   N   W   V

CGG CAG GCT CCA GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGC AAT ATC TAT CCT TCC GAC TCC TAC
 R   Q   A   P   G   Q   G   L   E   W   I   G   N   I   Y   P   S   D   S   Y

ACC AAC TAT AAC CAG AAA TTT AAG GAC AAA GCA ACA CTG ACC GTG GAC ACC TCT GCC AGC
 T   N   Y   N   Q   K   F   K   D   K   A   T   L   T   V   D   T   S   A   S

ACT GCT TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA AGC GAA GAT ACT GCC GTG TAC TAC TGC ACC
 T   A   Y   M   E   L   S   S   L   R   S   E   D   T   A   V   Y   Y   C   T

                                                                  NheI
AGG ACA AGC ATG GCC GAT TAC TGG GGA CAA GGG ACC CTG GTG ACC GTG AGC AGC GCT AGC
 R   T   S   M   A   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
```

Fig.70

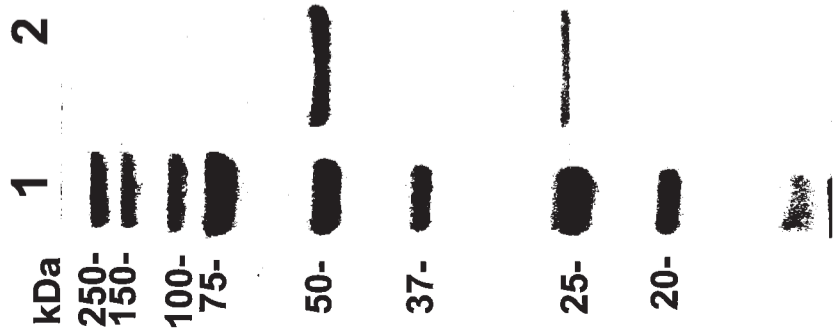


Fig.71

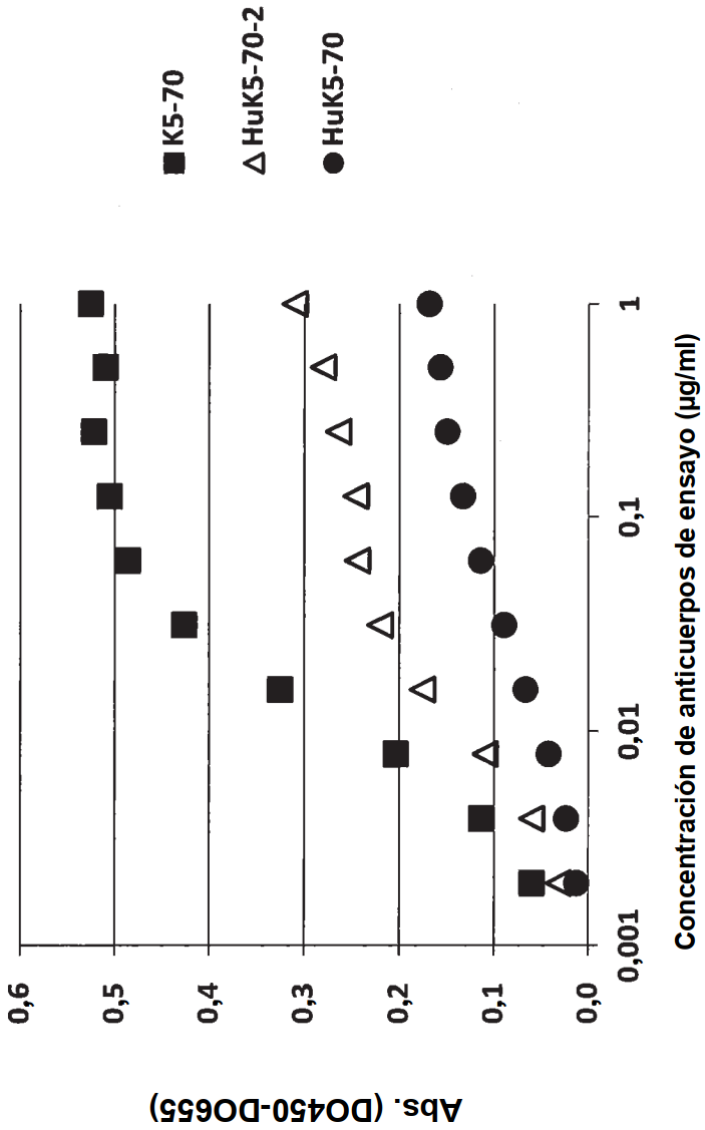

■K5-70
△HuK5-70-2
●HuK5-70
Abs. (DO450-DO655)
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
0,001
0,01
0,1
1
Concentración de anticuerpos de ensayo (µg/ml)

Fig.72A

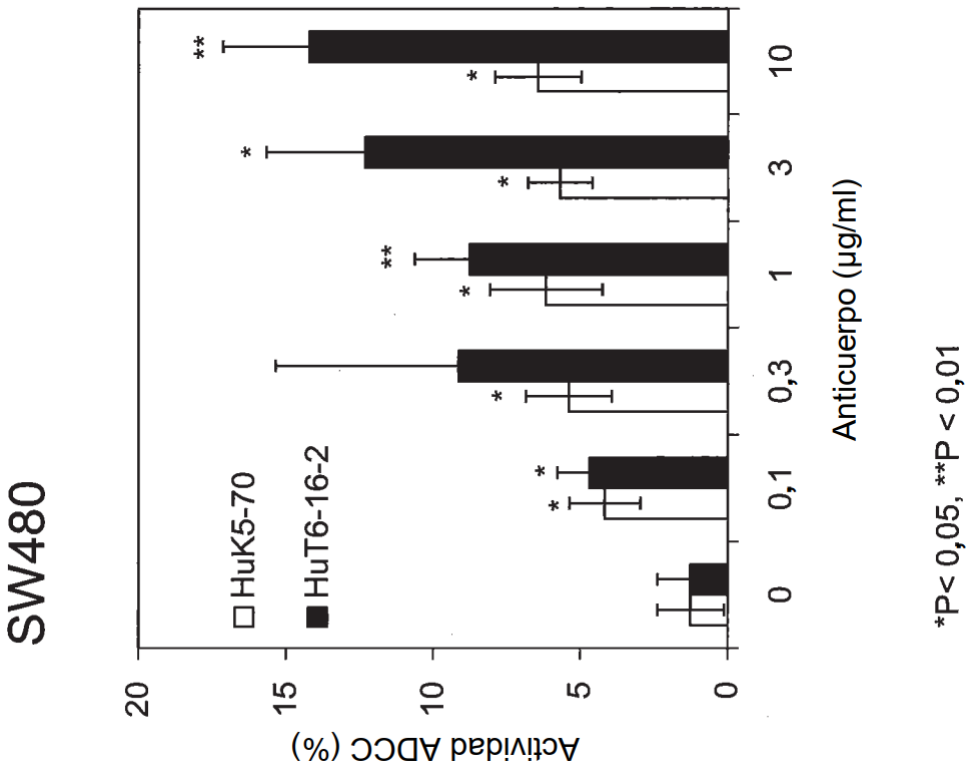

SW480
HuK5-70
HuT6-16-2
Actividad ADCC (%)
0
5
10
15
20
0
0,1
0,3
1
3
10
Anticuerpo (µg/ml)
*P< 0,05, **P < 0,01

Fig.72B

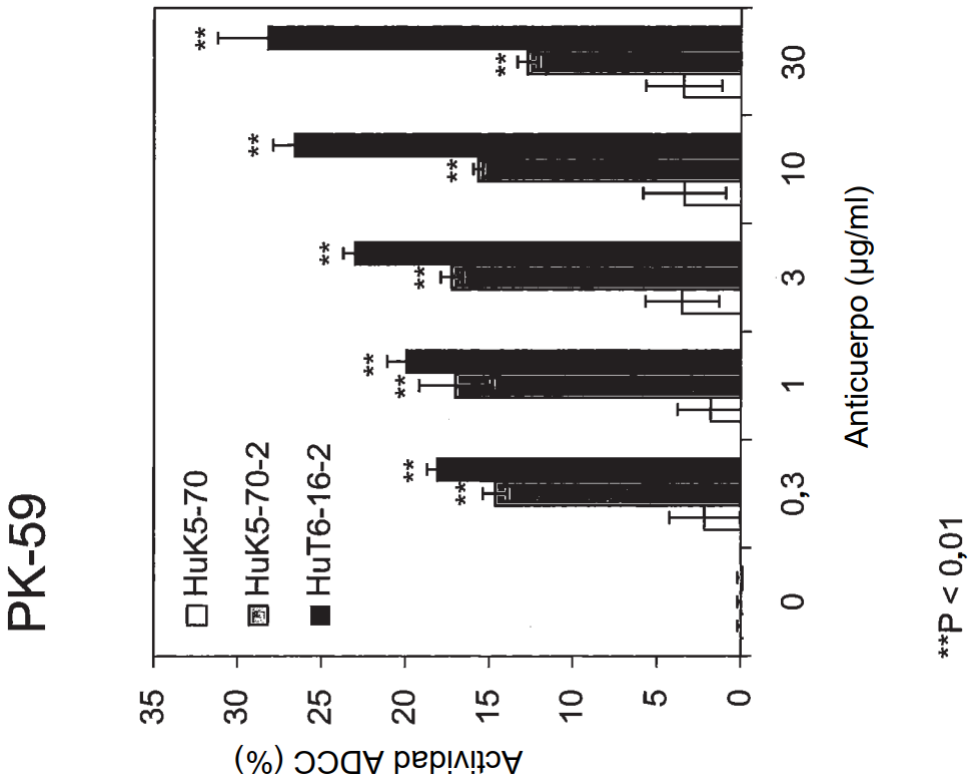
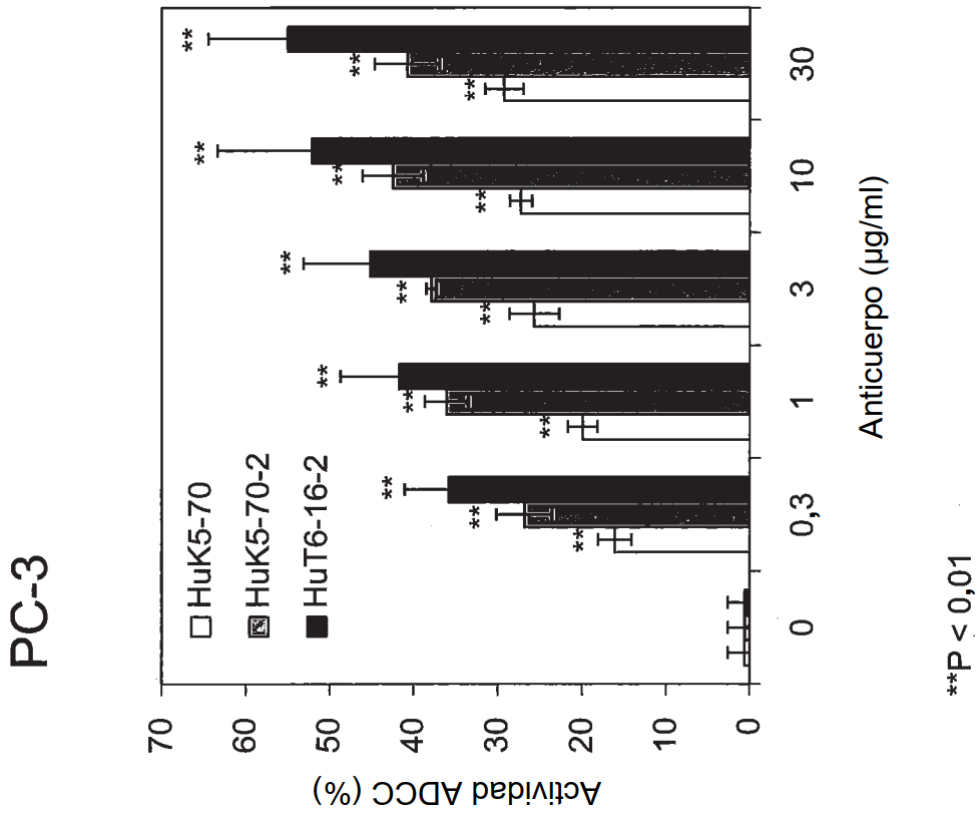

PK-59
HuK5-70
HuK5-70-2
HuT6-16-2
Actividad ADCC (%)
35
30
25
20
15
10
5
0
0
0,3
1
3
10
30
Anticuerpo (µg/ml)
**P < 0,01

Fig.72C


PC-3
HuK5-70
HuK5-70-2
HuT6-16-2
Actividad ADCC (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
0
0,3
1
3
10
30
Anticuerpo (µg/ml)
**P < 0,01