



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

F=F=6

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-100190- -00007-0000

Fecha: 2015-08-25 17:07:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 7-8

**SOLICITUD DIVISI
DE PATENTE C
INVENCION**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5



No. 15-199150- -00000-0000

Fecha: 2015-08-25 17:07:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 7-8

TITULO: ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA TROP-2 Y SUS USOS.

SOLICITANTE: RINAT NEUROSCIENCE CORP.

EXPEDIENTE No. 14-100.190

DIRECCIÓN: 230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080
(US).

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 24 de agosto de 2015

P2014/000065A



No. 14-100190-00007-0000

Fecha: 2015-08-25 17:07:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 7-9



No. 15-199150-00000-0000

Fecha: 2015-08-25 17:07:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 7-9

DIRECCIÓN DE NUEV
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FI

1. Identificación del Trámite

☐

Conversión

☒

División

☐

Fusión

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

☐

Persona Natural

☒

Persona Jurídica

RINAT NEUROSCIENCE CORP.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa

☐

Micro

☐

Pequeña

☐

Mediana

☐

Otra

Documento de Identificación

☐

C.C.

☐

C.E.

☒

NIT

☐

Otro

Número

Nacionalidad/Pais de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estados Unidos	230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080 (US)	California
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐

Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

CARLOS R. OLARTE

Apellidos y Nombre

79.782.747 Bta

Documento de identificación

74.295

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.		
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
office@moore.com	601-7799	601-7700

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sirvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite:

CONVERSION

Expediente No.

De:

A:

DIVISION

Expediente No.

14-100.190

No. de divisionales

FUSION

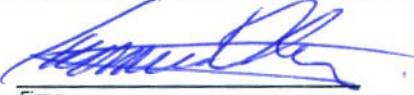
Expediente No.

Expediente No.

2

5. Comprobante de Pago No	Fecha
---------------------------	-------

6. Anexos	
☒	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
☒	Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
☒	Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
☐	Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
☒	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
CARLOS R. OLARTE	
Nombre y apellidos	Firma
79.782.747	74.295
C.C.	Tarjeta Profesional

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.



Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2014/000065A

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: RINAT NEUROSCIENCE CORP.

Dirección: 230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080 (US)

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá, Colombia

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA.

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2012/056234

Fecha

Noviembre 07, 2012

Publicación Internacional No. WO 2013/068946

Fecha

Mayo 16, 2013

6

Título (54) ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA TROP-2 Y SUS USOS

Clasificación Internacional (51) C07K 16/30, A61K 47/48

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

US

US

(32) Fecha

Noviembre 11, 2011

Abril 30, 2012

Octubre 23, 2012

(31) Número de Solicitud

61/559,015

61/640,641

61/717,288

9

Comprobante de pago No. 14-

Fecha _____

10

ANEXOS

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones. Declaración bajo la Regla 417(ii) del PCT.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

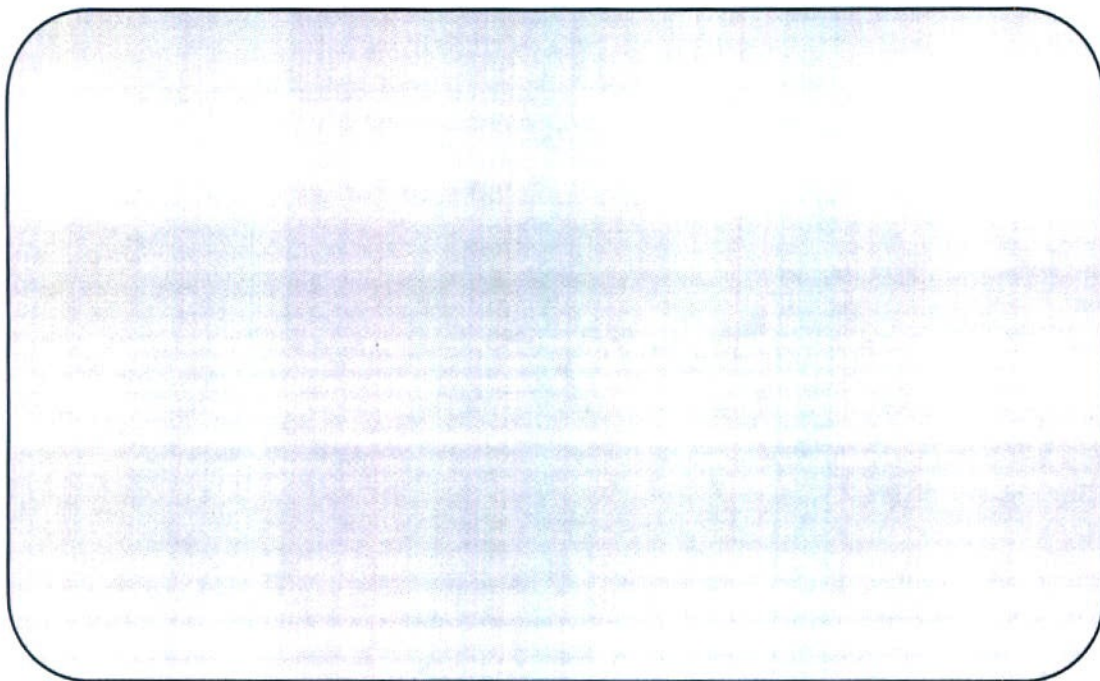


De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

<LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2012/056234

Shu-Hui LIU

361 Saint Martin Drive,
Redwood City, California, 94065,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Wei-Hsien HO

917 Academy Avenue,
Belmont, California, 94002,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Pavel STROP

130 Barneson Avenue, #4,
San Mateo, California, 94402,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Magdalena Grazyna DORYWALSKA

339 Beresford Avenue,
Redwood City, California, 94061,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Canadiense

Arvind RAJPAL

519 Foerster Street,
San Francisco,
California, 94127,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

David Louis SHELTON

5845 Clover Drive, Oakland,
California, 94618,
Estados Unidos de America
Nacionalidad: Estadounidense

Thomas-Toan TRAN

3935 Mosher Drive,
San Jose, California, 95135,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	TESTIGO DOCUMENTAL	Folio: <u>6</u>
--	---------------------------	-----------------

Dependencia Jerárquica: DEL PROPIEDAD INDUSTRIAL		Código	2000
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES		Código	2020
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicator:			
DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA			
Nombre de la Serie / Subserie:		Código:	
Expediente: 14-100190-7 15-199150-0		Solicitante / Quejoso / Demandante / otros.	
Prueba excluida: <u>cd</u>			
Nº. de Pruebas excluidas: <u>1</u>			
Fecha de emisión de la Prueba:			
UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO			
Nº. de bloque:		Otras especificaciones:	
Nº. de rodante:			
Nº. de estante:			
Nº. de archivador:			
Nº. de entrepaño:			
Nº. de gaveta:			
Nº. de caja:			
IMPORTANTE: - El material gráfico o especial que se encuentra dentro o anexo a las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos. - Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códigos, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.			
Observaciones: <u>cd contiene</u> <u>14 archivos en formato PDF</u> <u>procesados y cargados al sistema</u> <u>Andres</u>		Unidad de Conservación ☐ Bolsa ☐ Caja ☐ Libro ☐ Sobre ☐ Tomo ☐ Otro Soporte Documental ☒ CD ☐ Disquete ☐ DVD ☐ Folleto ☐ Periódico ☐ Plano ☐ Publicación Periódica ☐ USB ☐ Otro	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0090804

Bogotá D.C., Agosto 19 de 2015 - 13:04:53

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	705549401	14/08/2015	6.932.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
------------------	----------	--------------	-------------

1 50005-01-01 SOLICITUDES

2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE
DE INVENCIÓN CONT. DERE

478.000.00

478.000.00

\$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-100190-00007-0000

Fecha: 2015-08-25 17:07:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios 7-8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-199150-00000-0000

Fecha: 2015-08-25 17:07:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios 7-8

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
 - ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o c
 - ☐ Representación gráfica de un esquema c
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas estab
- Completa ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-100190-00007-0000

Fecha: 2015-08-25 17:07:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASC
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 7-8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-199150-00000-0000

Fecha: 2015-08-25 17:07:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASC
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI⁸
Act. 411 PRESENTACION Folios: 7-8

	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión	☒ División	☐ Fusión
☒ Patente de Invención		
☐ Patente de Modelo de Utilidad		

2. Datos del solicitante

☐ Persona Natural	☒ Persona Jurídica
--	--

RINAT NEUROSCIENCE CORP.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa ☐ Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra

Documento de Identificación ☐ C.C. ☐ C.E. ☒ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/Pais de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estados Unidos	230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080 (US)	California
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐	Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico
--------------------------	--

3. Datos del apoderado:

CARLOS R. OLARTE	79.782.747 Bta	74.295
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.		
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
office@mourer.com	601-7799	601-7700

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del trámite:

CONVERSION Expediente No. _____ De: _____ A: _____	DIVISION Expediente No. 14-100.190 No. de divisionales _____	FUSION Expediente No. _____ Expediente No. _____
--	---	---

5. Comprobante de Pago No	_____	Fecha	<table><tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table>			

6. Anexos						
<table><tr><td>X</td></tr><tr><td>X</td></tr><tr><td>X</td></tr><tr><td> </td></tr><tr><td>X</td></tr></table>	X	X	X		X	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación Número de documento que ordena la comisión o fusión o división Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético
X						
X						
X						
X						

7. Firma	
CARLOS R. OLARTE Nombre y apellidos	_____ Firma
79.782.747 C.C.	74.295 Tarjeta Profesional



Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DIVISIONAL DE
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2014/000065A

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: RINAT NEUROSCIENCE CORP.

Dirección: 230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080 (US)

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá, Colombia

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA.

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2012/056234

Fecha

Noviembre 07, 2012

Publicación Internacional No. WO 2013/068946

Fecha

Mayo 16, 2013

6

Título (54) ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA TROP-2 Y SUS USOS

Clasificación Internacional (51) C07K 16/30, A61K 47/48

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

US

US

(32) Fecha

Noviembre 11,2011

Abril 30, 2012

Octubre 23,2012

(31) Número de Solicitud

61/559,015

61/640,641

61/717,288

9

Comprobante de pago No. 14-

Fecha

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☒

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 417(ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

<LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2012/056234

Shu-Hui LIU

361 Saint Martin Drive,
Redwood City, California, 94065,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Wei-Hsien HO

917 Academy Avenue,
Belmont, California, 94002,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Pavel STROP

130 Barneson Avenue, #4,
San Mateo, California, 94402,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Magdalena Grazyna DORYWALSKA

339 Beresford Avenue,
Redwood City, California, 94061,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Canadiense

Arvind RAJPAL

519 Foerster Street,
San Francisco,
California, 94127,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

David Louis SHELTON

5845 Clover Drive, Oakland,
California, 94618,
Estados Unidos de America
Nacionalidad: Estadounidense

Thomas-Toan TRAN

3935 Mosher Drive,
San Jose, California, 95135,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

TRADUCCIÓN OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTÁ ORIGINALMENTE EN INGLÉS

Nota del traductor:

El documento adjunto de poder de Rinat Neuroscience Corp, a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana Maria Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro lleva los siguientes datos en inglés.

Reconocimiento para todos los propósitos de California

Estado de California

Condado de San Mateo

El día 11 de Septiembre de 2006, ante mí, Beth Calvin, Notario Público, se presentó personalmente Carol Stratford, a quien conozco personalmente como la persona cuyo nombre está suscrito al documento y reconoció ante mí que ejecutó el mismo en su calidad autorizada y que por su firma en el instrumento, la persona o la entidad en cuyo nombre actuó, ejecutó el instrumento.

En constancia firmo y pongo mi sello oficial. (Firmado)

Sello: Beth Calvin, comisión No. 1440211- Notario Público de California, Condado de Santa Clara. Mi comisión vence el 19 de Septiembre de 2007.

Opcional:

Aunque la información siguiente no es exigida por ley, puede ser valiosa para que las personas confíen en el documento y puede evitar que se


Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

quite fraudulentamente y que se coloque este formulario a otro documento.

Descripción del documento adjunto:

Documento de Poder.

Fecha del documento: 9/11/06.

Número de páginas: 1.

Firmantes además del ya mencionado: Ninguno.

Apostilla adjunta:

ESTADO DE CALIFORNIA	
SECRETARIO DE ESTADO	
APOSTILLE	
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. País:	Estados Unidos de América
<u>El presente documento público</u>	
2. Ha sido firmado por:	Beth Calvin
3. Actuando en calidad de:	Notario Público, Estado de California.
4. Lleva el sello/estampilla de:	Beth Calvin, Notario Público, Estado de California
<u>Certificado</u>	
5. En:	Sacramento, California
6. El:	Día 15 de Septiembre de 2006
7. Por:	Subsecretario de Estado, Estado de California.
8. Bajo el No.	304683
9. Sello:	Gran Sello del Estado de California
10. Firma:	Bruce McPherson, Secretario de Estado

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Rinat N. - Poder"

Fecha: 17 de Octubre de 2006.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 8602


Traductor
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

RINAT NEUROSCIENCE CORP.

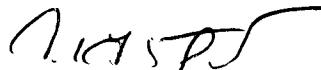
domiciled in

domiciliado en

230 E. Grand Avenue, South San Francisco, California 94080, U.S.A.

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

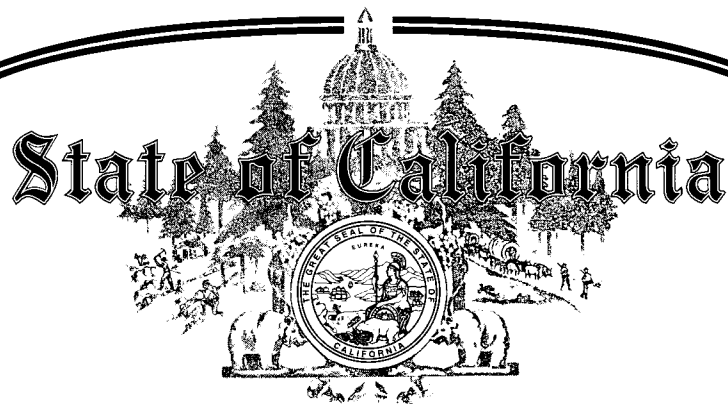
por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma: 

Date/Fecha: 11 September 2006

City/Country/Ciudad,País: South San Francisco, CA, U.S.A.

So. San Francisco, CA



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by Beth Calvin*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Beth Calvin, Notary Public,*
State of California

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 15th day of September 2006*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 304683*
9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*



Secretary of State



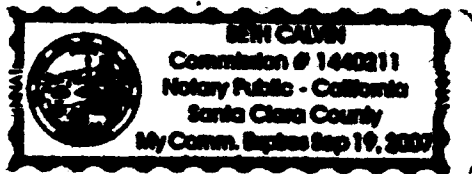
CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Mateo } ss.

On 11 September 2006 before me, Beth Calvin, Notary Public,
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")
personally appeared Carol Stratford,
Name(s) of Signer(s)

☒ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence



to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

[Signature]
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Power of Attorney

Document Date: 9/11/06 Number of Pages: 1

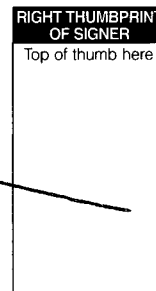
Signer(s) Other Than Named Above: none

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____



PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-1-1	Declaration: Identity of the Inventor Declaration as to the identity of the inventor (Rules 4.17(i) and 51bis.1(a)(i))	In relation to this international application
	Name (LAST, First) Address	LIU, Shu-Hui of 361 Saint Martin Drive Redwood City, California 94065 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	HO, Wei-Hsien of 917 Academy Avenue Belmont, California 94002 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	STROP, Pavel of 130 Barneson Avenue #4 San Mateo, California 94402 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	DORYWALSKA, Magdalena Grazyna of 339 Beresford Avenue Redwood City, California 94061 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	RAJPAL, Arvind of 519 Foerster Street San Francisco, California 94127 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	SHELTON, David Louis of 5845 Clover Drive Oakland, California 94618 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	TRAN, Thomas-Toan of 3935 Mosher Drive San Jose, California 95135 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application RINAT NEUROSCIENCE CORP. is entitled to claim priority of earlier application No. 61/559,015 by virtue of the following:
VIII-3-1(i v)		an assignment from LIU, Shu-Hui to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 07 December 2011 (07.12.2011)
VIII-3-1(i v)		an assignment from HO, Wei-Hsien to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 07 December 2011 (07.12.2011)
VIII-3-1(i v)		an assignment from SHELTON, David Louis to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 07 December 2011 (07.12.2011)
VIII-3-1(i v)		an assignment from TRAN, Thomas-Toan to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 10 October 2012 (10.10.2012)

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-3-2	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application RINAT NEUROSCIENCE CORP. is entitled to claim priority of earlier application No. 61/640,641 by virtue of the following:
VIII-3-2(i v)		an assignment from LIU, Shu-Hui to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 06 July 2012 (06.07.2012)
VIII-3-2(i v)		an assignment from HO, Wei-Hsien to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 06 July 2012 (06.07.2012)
VIII-3-2(i v)		an assignment from STROP, Pavel to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 06 July 2012 (06.07.2012)
VIII-3-2(i v)		an assignment from DORYWALSKA, Magdalena Grazyna to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 06 July 2012 (06.07.2012)
VIII-3-2(i v)		an assignment from RAJPAL, Arvind to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 06 July 2012 (06.07.2012)
VIII-3-2(i v)		an assignment from SHELTON, David Louis to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 06 July 2012 (06.07.2012)
VIII-3-2(i v)		an assignment from TRAN, Thomas-Toan to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 10 October 2012 (10.10.2012)

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-3-3	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application RINAT NEUROSCIENCE CORP. is entitled to claim priority of earlier application No. 61/717,288 by virtue of the following:
VIII-3-3(i v)		an assignment from LIU, Shu-Hui to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 29 October 2012 (29.10.2012)
VIII-3-3(i v)		an assignment from HO, Wei-Hsien to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 29 October 2012 (29.10.2012)
VIII-3-3(i v)		an assignment from STROP, Pavel to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 29 October 2012 (29.10.2012)
VIII-3-3(i v)		an assignment from DORYWALSKA, Magdalena Grazyna to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 23 October 2012 (23.10.2012)
VIII-3-3(i v)		an assignment from RAJPAL, Arvind to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 29 October 2012 (29.10.2012)
VIII-3-3(i v)		an assignment from SHELTON, David Louis to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 29 October 2012 (29.10.2012)
VIII-3-3(i v)		an assignment from TRAN, Thomas-Toan to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 29 October 2012 (29.10.2012)

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application RINAT NEUROSCIENCE CORP., US Application Number 61/559,015, Filed: 11 November 2011 is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i v)		an assignment from LIU, Shu-Hui to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 07 December 2011 (07.12.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from HO, Wei-Hsien to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 07 December 2011 (07.12.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from SHELTON, David Louis to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 07 December 2011 (07.12.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from TRAN, Thomas-Toan to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 10 October 2012 (10.10.2012)

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-2-2	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application RINAT NEUROSCIENCE CORP., US Application Number 61/640,641, Filed: 30 April 2012 is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-2(i v)		an assignment from LIU, Shu-Hui to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 06 July 2012 (06.07.2012)
VIII-2-2(i v)		an assignment from HO, Wei-Hsien to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 06 July 2012 (06.07.2012)
VIII-2-2(i v)		an assignment from STROP, Pavel to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 06 July 2012 (06.07.2012)
VIII-2-2(i v)		an assignment from DORYWALSKA, Magdalena Grazyna to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 06 July 2012 (06.07.2012)
VIII-2-2(i v)		an assignment from RAJPAL, Arvind to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 06 July 2012 (06.07.2012)
VIII-2-2(i v)		an assignment from SHELTON, David Louis to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 06 July 2012 (06.07.2012)
VIII-2-2(i v)		an assignment from TRAN, Thomas-Toan to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 10 October 2012 (10.10.2012)

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-2-3	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application RINAT NEUROSCIENCE CORP., US Application Number 61/717,288, Filed: 23 October 2012 is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-3(i v)		an assignment from LIU, Shu-Hui to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 29 October 2012 (29.10.2012)
VIII-2-3(i v)		an assignment from HO, Wei-Hsien to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 29 October 2012 (29.10.2012)
VIII-2-3(i v)		an assignment from STROP, Pavel to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 29 October 2012 (29.10.2012)
VIII-2-3(i v)		an assignment from DORYWALSKA, Magdalena Grazyna to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 23 October 2012 (23.10.2012)
VIII-2-3(i v)		an assignment from RAJPAL, Arvind to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 29 October 2012 (29.10.2012)
VIII-2-3(i v)		an assignment from SHELTON, David Louis to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 29 October 2012 (29.10.2012)
VIII-2-3(i v)		an assignment from TRAN, Thomas-Toan to RINAT NEUROSCIENCE CORP., dated 29 October 2012 (29.10.2012)



- (51) International Patent Classification:
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/IB2012/056234
- (22) International Filing Date:
7 November 2012 (07.11.2012)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/559,015 11 November 2011 (11.11.2011) US
61/640,641 30 April 2012 (30.04.2012) US
61/717,288 23 October 2012 (23.10.2012) US
- (71) Applicant: RINAT NEUROSCIENCE CORP. [US/US];
230 East Grand Avenue, South San Francisco, California
94080 (US).
- (72) Inventors: LIU, Shu-Hui; 361 Saint Martin Drive, Red-
wood City, California 94065 (US). HO, Wei-Hsien; 917
Academy Avenue, Belmont, California 94002 (US).
STROP, Pavel; 130 Barneson Avenue, #4, San Mateo,

California 94402 (US). DORYWALSKA, Magdalena,
Grazyna; 339 Beresford Avenue, Redwood City, Califor-
nia 94061 (US). RAJPAL, Arvind; 519 Foerster Street,
San Francisco, California 94127 (US). SHELTON, David,
Louis; 5845 Clover Drive, Oakland, California 94618
(US). TRAN, Thomas-Toan; 3935 Mosher Drive, San
Jose, California 95135 (US).

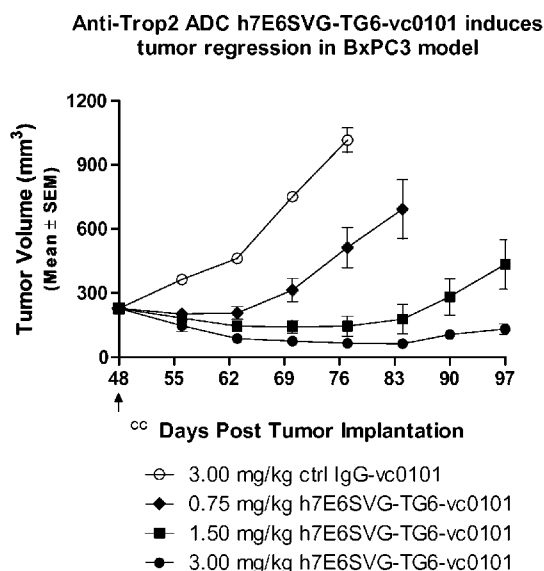
(74) Agents: KLEIMAN, Gabriel L. et al.; Pfizer Inc., 235
East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODIES SPECIFIC FOR TROP-2 AND THEIR USES

Figure 9A



(57) Abstract: The present invention provides antibodies that specifically bind to trophoblast cell-surface antigen-2 (Trop-2). The invention further provides antibody conjugates comprising such antibodies, antibody encoding nucleic acids, and methods of obtaining such antibodies. The invention further relates to therapeutic methods for use of these antibodies and Trop-2 antibody conjugates for the treatment of a condition associated with Trop-2 expression (e.g., cancer), such as colon, esophageal, gastric, head and neck, lung, ovarian, or pancreatic cancer.



(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:

25 July 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/056234

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/30 A61K47/48
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

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

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

EP0-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/144891 A1 (ARIUS RES INC [CA]) 4 December 2008 (2008-12-04) the whole document ----- -/--	9,16,17, 22,23, 31-41

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 February 2013

Date of mailing of the international search report

04/06/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kalsner, Inge

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/056234

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOYCE VARUGHESE ET AL: "Cervical carcinomas overexpress human trophoblast cell-surface marker (Trop-2) and are highly sensitive to immunotherapy with hRS7, a humanized monoclonal anti-Trop-2 antibody", AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS & GYNECOLOGY, MOSBY, ST LOUIS, MO, US, vol. 205, no. 6, 29 June 2011 (2011-06-29), pages 567.e1-567.e7, XP028116550, ISSN: 0002-9378, DOI: 10.1016/J.AJOG.2011.06.093 [retrieved on 2011-07-13] the whole document	1-9, 16-41
Y	----- T. M. CARDILLO ET AL: "Humanized Anti-Trop-2 IgG-SN-38 Conjugate for Effective Treatment of Diverse Epithelial Cancers: Preclinical Studies in Human Cancer Xenograft Models and Monkeys", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 17, no. 10, 3 March 2011 (2011-03-03), pages 3157-3169, XP055044596, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2939 the whole document	1-9, 16-41
A	----- RHODA RAJI ET AL: "Uterine and ovarian carcinosarcomas overexpressing Trop-2 are sensitive to hRS7, a humanized anti-Trop-2 antibody", JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 30, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), page 106, XP055052404, ISSN: 1756-9966, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6135 abstract	36-41
X	----- WO 2007/095748 A1 (ARIUS RES INC [CA]) 30 August 2007 (2007-08-30) abstract	9,16,17, 22,23, 31-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2012/056234

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-9, 16, 17(completely); 18-41(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-9, 16, 17(completely); 18-41(partially)

An isolated anti-Trop-2 antibody designated 7E6 and variants thereof; conjugates comprising the antibody, an acyl donor glutamine-containing tag and a cytotoxic agent; pharmaceutical compositions, and methods of treating conditions associated with Trop-2 expression.

2. claims: 10-15(completely); 18-41(partially)

as above, but with respect to antibody 6G11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/056234

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008144891 A1	04-12-2008	AU 2008255528 A1	04-12-2008
		CA 2687586 A1	04-12-2008
		CN 101679526 A	24-03-2010
		CO 6140062 A2	19-03-2010
		CR 11127 A	29-12-2009
		EC SP099770 A	28-12-2009
		EP 2155791 A1	24-02-2010
		JP 2010528056 A	19-08-2010
		KR 20100003366 A	08-01-2010
		MA 31393 B1	03-05-2010
		US 2008131428 A1	05-06-2008
		WO 2008144891 A1	04-12-2008
		ZA 200908346 A	25-08-2010

WO 2007095748 A1	30-08-2007	AU 2007218961 A1	30-08-2007
		AU 2007218962 A1	30-08-2007
		CA 2643561 A1	30-08-2007
		CA 2643603 A1	30-08-2007
		CN 101426904 A	06-05-2009
		CN 101432422 A	13-05-2009
		EP 1996700 A1	03-12-2008
		EP 1996701 A1	03-12-2008
		JP 2009527230 A	30-07-2009
		JP 2009528995 A	13-08-2009
		US 2007202043 A1	30-08-2007
		US 2007202113 A1	30-08-2007
		US 2009142263 A1	04-06-2009
		US 2009191118 A1	30-07-2009
		WO 2007095748 A1	30-08-2007
		WO 2007095749 A1	30-08-2007



- (51) International Patent Classification:
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/IB2012/056234
- (22) International Filing Date:
7 November 2012 (07.11.2012)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/559,015 11 November 2011 (11.11.2011) US
61/640,641 30 April 2012 (30.04.2012) US
61/717,288 23 October 2012 (23.10.2012) US
- (71) Applicant: RINAT NEUROSCIENCE CORP. [US/US];
230 East Grand Avenue, South San Francisco, California
94080 (US).
- (72) Inventors: LIU, Shu-Hui; 361 Saint Martin Drive, Red-
wood City, California 94065 (US). HO, Wei-Hsien; 917
Academy Avenue, Belmont, California 94002 (US).
STROP, Pavel; 130 Barneson Avenue, #4, San Mateo,

California 94402 (US). DORYWALSKA, Magdalena,
Grazyna; 339 Beresford Avenue, Redwood City, Califor-
nia 94061 (US). RAJPAL, Arvind; 519 Foerster Street,
San Francisco, California 94127 (US). SHELTON, David,
Louis; 5845 Clover Drive, Oakland, California 94618
(US). TRAN, Thomas-Toan; 3935 Mosher Drive, San
Jose, California 95135 (US).

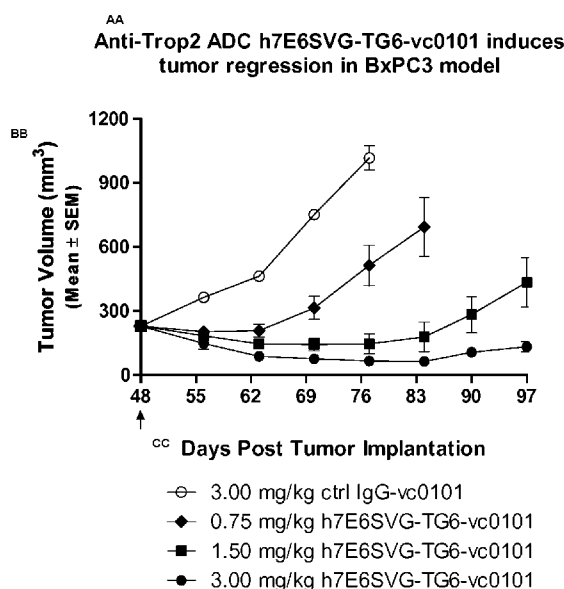
(74) Agents: KLEIMAN, Gabriel L. et al.; Pfizer Inc., 235
East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODIES SPECIFIC FOR TROP-2 AND THEIR USES

Figure 9A



(57) Abstract: The present invention provides antibodies that specifically bind to trophoblast cell-surface antigen-2 (Trop-2). The invention further provides antibody conjugates comprising such antibodies, antibody encoding nucleic acids, and methods of obtaining such antibodies. The invention further relates to therapeutic methods for use of these antibodies and Trop-2 antibody conjugates for the treatment of a condition associated with Trop-2 expression (e.g., cancer), such as colon, esophageal, gastric, head and neck, lung, ovarian, or pancreatic cancer.



(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

ANTIBODIES SPECIFIC FOR TROP-2 AND THEIR USES

Related Applications

This application claims the benefits of U.S. Provisional Application No. 61/559,015 filed November 11, 2011, U.S. Provisional Application No. 61/640,641 filed April 30, 2012, and U.S. Provisional Application No. 61/717,288 filed October 23, 2012 which are hereby incorporated by reference in their entireties.

Field

The present invention relates to antibodies, e.g., full length antibodies or antigen binding fragments thereof, that specifically bind to trophoblast cell-surface antigen (Trop-2). The invention further relates to antibody conjugates (e.g., antibody-drug-conjugates) comprising the Trop-2 antibodies, compositions comprising the Trop-2 antibodies, and methods of using the Trop-2 antibodies and their conjugates for treating conditions associated with Trop-2 expression (e.g., cancer).

Background

Trophoblast cell-surface antigen (Trop-2), also referred to as M1S1, GA733-1 (gastric antigen 733-1), EGP-1 (epithelial glycoprotein-1), or TACSTD2 (tumor-associated calcium signal transducer), is a cell surface glycoprotein originally identified in human placental trophoblast and subsequently found to be highly expressed in most human carcinomas, but showed only restricted or limited expression in normal adult tissues. See, e.g., Varughese et al., Gynecologic Oncology, 122:171-177, 2011. Trop-2 is highly conserved among species. For example, human Trop-2 protein shares 79% identity with murine Trop-2 protein. See Cubas et al., Molecular Cancer, 9:253, 2010. Although the biological role of Trop-2 is still unclear, various studies have shown that overexpression of Trop-2 correlates with increased tumor aggressiveness, metastasis, and poor prognosis in various human carcinomas, such as colon cancer, ovarian cancer, and pancreatic cancer. See, e.g., Fang et al., Int. J. Colorectal Dis, 24:875-884, 2009; Bignotti et al., Eur. J. Cancer, 46:944-953, 2010; and Fong et al., Br J Cancer, 99:1290-1295, 2008. Studies have also shown that Trop-2 contributes to tumor pathogenesis at least in part by activating the ERK1/2 MAPK pathway which has

- 2 -

important implications in cancer cell proliferation, migration, invasion, and survival. See Cubas et al., 2010, supra.

Overexpression of Trop-2 by epithelial tumor cells and its transmembrane location render Trop-2 an attractive target for cancer immunotherapy. Accordingly, a high affinity antibody to Trop-2, particularly to human Trop-2, would make a superior therapeutic agent for cancer treatment in human patients. Although various Trop-2 antibodies have been disclosed (see, e.g., U.S. Pat. No. 7,420,041 (antibody AR47A6.4.2), U.S. Pat. No. 5,850,854 (antibody BR110), U.S. Pat. No. 6,653,104 (antibody RS7), U.S. Pat. No. 7,517,964 (antibody RS7), US2012/0237518), it has been exceedingly difficult to identify monoclonal antibodies having high affinity, high specificity, and potent cytotoxic or tumor killing/inhibition/regression activity. There remains a need for antibodies and other immunotherapeutic agents (such as antibody-drug conjugates) directed against Trop-2 having improved efficacy and safety profile, and which are suitable for use with human patients.

Summary

The invention disclosed herein is directed to antibodies and antibody conjugates (e.g., antibody-drug conjugates) that bind to Trop-2. In one aspect, the invention provides an antibody or antibody conjugate that specifically binds to domain 3 (e.g., amino acid residues 152-206) and domain 4 (e.g., amino acid residues 209-274) of human Trop-2 (SEQ ID NO:27) with a monovalent antibody binding affinity (K_D) of about 6.5 nM or less as measured by surface plasmon resonance.

In another aspect, the invention provides an isolated antibody, or an antigen binding fragment thereof, which specifically binds to Trop-2, wherein the antibody comprises a) a heavy chain variable (VH) region complementary determining regions comprising (i) a VH complementary determining region one (CDR1) comprising the sequence SYGVH (SEQ ID NO: 30), GGSISSY (SEQ ID NO: 36), or GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37); (ii) a VH CDR2 comprising the sequence VIWTX₁GX₂TDYNSALMX₃, wherein X₁ is G or S; X₂ is S or V; X₃ is S or G (SEQ ID NO: 49), or WTX₁GX₂ wherein X₁ is G or S, X₂ is S or V (SEQ ID NO: 50); and iii) a VH CDR3 comprising the sequence DGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 35); DYDRYTX₁DY, wherein X₁ is E or M (SEQ ID NO: 82); or DYDRYTX₁DY, wherein X₁ is any naturally occurring amino acid,

- 3 -

e.g., A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, or V (SEQ ID NO: 83) and/or
 b) a light chain variable region (VL) region complementary determining regions
 comprising (i) a VL CDR1 comprising the sequence RASKSVSTSX₁YSYMH, wherein
 X₁ is G, L, or N (SEQ ID NO: 63); (ii) a VL CDR2 comprising the sequence LASNLES
 5 (SEQ ID NO: 55); and (iii) a VL CDR3 comprising the sequence VLQHSRELPYT (SEQ
 ID NO: 56). In some embodiments, the antibody does not comprise a heavy chain
 variable region of the sequence
 QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGST
 DYNALMSRLSINKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARDGDYDRYTMDYWGQGT
 10 SVTVSS (SEQ ID NO: 2) and a light chain variable region of the sequence
 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWWYQQKPGQPPKLLIYLASNLE
 SGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPYTFGGGTKEIK (SEQ ID
 NO: 1).

In another aspect, the invention provides an isolated antibody, or an antigen
 15 binding fragment thereof, which specifically binds to Trop-2, wherein the antibody
 comprises: a VH region comprising a VH CDR1, VH CDR2, and VH CDR3 of the VH
 sequence shown in SEQ ID NO: 5, 84, or 85; and/or a VL region comprising VL CDR1,
 VL CDR2, and VL CDR3 of the VL sequence shown in SEQ ID NO: 3 or 6. In some
 embodiments, the VH region comprises (i) a VH CDR1 comprising the sequence
 20 SYGVH (SEQ ID NO: 30), GGSISSY (SEQ ID NO: 36), or GGSISSYGVH (SEQ ID NO:
 37); (ii) a VH CDR2 comprising the sequence VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38)
 or WTSGV (SEQ ID NO: 39); and (iii) a VH CDR3 comprising the sequence
 DGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 35) or DYDRYTX₁DY, wherein X₁ is E or M (SEQ ID
 NO: 82). In some embodiments, the VL region comprises (i) a VL CDR1 comprising the
 25 sequence RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO: 54) or RASKSVSTSLYSYMH (SEQ ID
 NO: 57); (ii) a VL CDR2 comprising the sequence LASNLES (SEQ ID NO: 55); and (iii)
 a VL CDR3 comprising the sequence QHSRELPYT (SEQ ID NO: 56). In some
 embodiments, the antibody comprises (a) heavy chain CDRs comprising: (i) a CDR1
 comprising the sequence SYGVH (SEQ ID NO: 30), GGSISSY (SEQ ID NO: 36), or
 30 GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37); (ii) a CDR2 comprising the sequence
 VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) or WTSGV (SEQ ID NO: 39); and (iii) a
 CDR3 comprising the sequence DGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 35), DYDRYTMDY

- 4 -

(SEQ ID NO: 99), or DYDRYTEDY (SEQ ID NO: 100); and b) light chain CDRs comprising (i) a CDR1 comprising the sequence RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO: 54) or RASKSVSTSLYSYMH (SEQ ID NO: 57); (ii) a CDR2 comprising the sequence LASNLES (SEQ ID NO: 55); and (iii) a CDR3 comprising the sequence QHSRELPYT (SEQ ID NO: 56). In some embodiments, the VH region comprises the sequence shown in SEQ ID NO: 5, 84, or 85 or a variant with one or several conservative amino acid substitutions in residues that are not within a CDR and/or the VL region comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 3, 6, or a variant thereof with one or several amino acid substitutions in amino acids that are not within a CDR. In some
5
10
15
embodiments, the antibody comprises a light chain comprising the sequence shown in SEQ ID NO: 66 and/or a heavy chain comprising the sequence shown in SEQ ID NO: 65. In some embodiments, the antibody comprises a VH region produced by the expression vector with ATCC Accession No. PTA-12872. In some embodiments, the antibody comprises a VL region produced by the expression vector with ATCC Accession No. PTA-12871.

In another aspect, the invention provides an isolated antibody, or an antigen binding fragment thereof, which specifically binds to domain 1 (e.g., amino acid residues 31-71) of human Trop-2 (SEQ ID NO:27) with a binding affinity (K_D) of about 35 nM or less as measured by surface plasmon resonance.

In another aspect, the invention provides an isolated antibody, or an antigen binding fragment thereof, which specifically binds to Trop-2, wherein the antibody comprises a) a heavy chain variable (VH) region complementary determining regions comprising (i) a VH CDR1 comprising the sequence SYWIN (SEQ ID NO: 40), GYTFTSY (SEQ ID NO: 41), or GYTFTSYWIN (SEQ ID NO: 42); (ii) a VH CDR2
20
25
comprising the sequence NIX₁PSDSYSN₂YX₂KFKD wherein X₁ is Y or F; X₂ is Q or K (SEQ ID NO: 51), or X₁PSDSY wherein X₁ is Y or F (SEQ ID NO:52); and (iii) a VH CDR3 comprising the sequence GSX₁FDY wherein X₁ is S or G (SEQ ID NO: 53); and/or b) a VL region complementary determining regions comprising (i) a VL CDR1 comprising the sequence RASQTIGTSIH (SEQ ID NO: 59); (ii) a VL CDR2 comprising
30
the sequence YASESIS (SEQ ID NO: 60); and (iii) a VL CDR3 comprising the sequence X₁QX₂SWPFT wherein X₁ is Q or S; X₂ is N or F (SEQ ID NO: 64).

- 5 -

In another aspect, the invention provides an isolated antibody, or an antigen binding fragment thereof, which specifically binds to Trop-2, wherein the antibody comprises: a VH region comprising a VH CDR1, VH CDR2, and VH CDR3 of the VH sequence shown in SEQ ID NO: 13; and/or a VL region comprising VL CDR1, VL CDR2, and VL CDR3 of the VL sequence shown in SEQ ID NO: 12. In some embodiments, the VH region comprises (i) a VH CDR1 comprising the sequence SYWIN (SEQ ID NO: 40), GYTFTSY (SEQ ID NO: 41), or GYTFTSYWIN (SEQ ID NO: 42); (ii) a VH CDR2 comprising the sequence NIFPSDSYSNYNKKFKD (SEQ ID NO: 46) or FPSDSY (SEQ ID NO: 47); and (iii) a VH CDR3 comprising the sequence GSGFDY (SEQ ID NO: 48). In some embodiments, the VL region comprises (i) a VL CDR1 comprising the sequence RASQTIGTSIH (SEQ ID NO: 59); (ii) a VL CDR2 comprising the sequence YASESIS (SEQ ID NO: 60); and (iii) a VL CDR3 comprising the sequence SQSFSWPFT (SEQ ID NO: 62). In some embodiments, the antibody comprises (a) heavy chain CDRs comprising: (i) a CDR1 comprising the sequence SYWIN (SEQ ID NO: 40), GYTFTSY (SEQ ID NO: 41), or GYTFTSYWIN (SEQ ID NO: 42); (ii) a CDR2 comprising the sequence NIFPSDSYSNYNKKFKD (SEQ ID NO: 46) or FPSDSY (SEQ ID NO: 47); and (iii) a VH CDR3 comprising the sequence GSGFDY (SEQ ID NO: 48); and b) light chain CDRs comprising: (i) a CDR1 comprising the sequence RASQTIGTSIH (SEQ ID NO: 59); (ii) a CDR2 comprising the sequence YASESIS (SEQ ID NO: 60); and (iii) a CDR3 comprising the sequence SQSFSWPFT (SEQ ID NO: 62). In some embodiments, the VH region comprises the sequence shown in SEQ ID NO: 13 or a variant with one or several conservative amino acid substitutions in residues that are not within a CDR and/or the VL region comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 12 or a variant thereof with one or several amino acid substitutions in amino acids that are not within a CDR. In some embodiments, the antibody comprises a light chain comprising the sequence shown in SEQ ID NO: 68 and a heavy chain comprising the sequence shown in SEQ ID NO: 67.

In some embodiments, the antibody can be a human antibody, a humanized antibody, or a chimeric antibody. In some embodiments, the antibody is a monoclonal antibody.

In some embodiments, the antibody comprises a constant region. In some embodiments, the antibody is of the human IgG1, IgG2 or IgG2Δa, IgG3, or IgG4

- 6 -

subclass. In some embodiments, the antibody comprises a glycosylated constant region. In some embodiments, the antibody comprises a constant region having increased binding affinity to one or more human Fc gamma receptor(s).

In another aspect, the invention provides an isolated antibody which specifically
5 binds to Trop-2 and competes with the antibodies as described herein (e.g., m7E6, h7E6_SVG, h7E6_SVG4, h7E6_SVG19, h7E6_SVG6, h7E6_SVG20, h7E6_SVG22, h7E6_SVG28, h7E6_SVG30, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h7E6_SVGN, m6G11, h6G11, or h6G11_FKG_SF). In some embodiments, the antibody competes with h7E6_SVG and
10 has a monovalent antibody binding affinity (K_D) of about 6.5 nM or less as measured by surface plasmon resonance.

In another aspect, the invention provides a conjugate of the antibody or the antigen binding fragment as described herein, wherein the antibody or the antigen binding fragment is conjugated to an agent, wherein the agent is selected from the
15 group consisting of a cytotoxic agent, an immunomodulating agent, an imaging agent, a therapeutic protein, a biopolymer, and an oligonucleotide. In some embodiments, the agent is a cytotoxic agent (e.g., monomethyl auristatin D (MMAD) or other auristatins).

In another aspect, the invention provides an isolated antibody comprising an acyl donor glutamine-containing tag engineered at a specific site of the antibody. In some
20 embodiments, the tag comprises amino acid glutamine (Q) or an amino acid sequence GLLQGG (SEQ ID NO:78), LLQGA (SEQ ID NO:79), GLLQGA (SEQ ID NO:81), LLQ, or LLQX₁X₂X₃X₄X₅, wherein X₁ is G or P, wherein X₂ is A, G, P, or absent, wherein X₃ is A, G, K, P, or absent, wherein X₄ is G, K, or absent, and wherein X₅ is K or absent (SEQ ID NO: 88). In some embodiments, the Trop-2 antibody or the
25 conjugate as described herein comprises an acyl donor glutamine-containing tag engineered at a specific site, such as G, GLLQGG (SEQ ID NO:78), LLQGA (SEQ ID NO:79), GLLQGA (SEQ ID NO:81), LLQ, or LLQX₁X₂X₃X₄X₅, wherein X₁ is G or P, wherein X₂ is A, G, P, or absent, wherein X₃ is A, G, K, P, or absent, wherein X₄ is G, K, or absent, and wherein X₅ is K or absent (SEQ ID NO: 88).

30 In one variation, the invention provides an isolated antibody comprising an acyl donor glutamine-containing tag and an amino acid modification at position 222, 340, or 370 of the antibody (Kabat numbering scheme), wherein the modification is an amino

acid deletion, insertion, substitution, mutation, or any combination thereof. In some embodiments, the Trop-2 antibody or the conjugate as described herein comprises the acyl donor glutamine-containing tag (e.g., Q, GLLQGG (SEQ ID NO:78), LLQGA (SEQ ID NO:79), GLLQGA (SEQ ID NO:81), LLQ, or LLQX₁X₂X₃X₄X₅, wherein X₁ is G or P, wherein X₂ is A, G, P, or absent, wherein X₃ is A, G, K, P, or absent, wherein X₄ is G, K, or absent, and wherein X₅ is K or absent (SEQ ID NO: 88)) engineered at a specific site (e.g., at a carboxyl terminus of the heavy or light chain or at an another site) of the Trop-2 antibody and an amino acid modification at position 222, 340, or 370 of the antibody (Kabat numbering scheme). In some embodiments, the amino acid modification is a substitution from lysine to arginine.

In another aspect, the invention provides a conjugate of the antibody or the antigen binding fragment as described herein, wherein the conjugate comprises the formula: antibody-(acyl donor glutamine-containing tag)-(linker)-(cytotoxic agent), wherein the acyl donor glutamine-containing tag is engineered at a specific site of the antibody or the antigen binding fragment (e.g., at a carboxyl terminus of the heavy or light chain or at an another site), wherein the tag is conjugated to a linker (e.g., a linker containing one or more reactive amines (e.g., primary amine NH₂)), and wherein the linker is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., MMAD or other auristatins).

In some embodiments, the conjugate is selected from the group consisting of 1) antibody-LLQGA-(acetyl-lysine-valine-citrulline-*p*-aminobenzyloxycarbonyl)-0101, wherein acetyl-lysine-valine-citrulline-*p*-aminobenzyloxycarbonyl is AcLys-VC-PABC, and wherein 0101 is 2-methylalanyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-[(1*S*)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl]-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamide; 2) antibody-LLQGA- AcLys-VC-PABC-MMAD; 3) antibody-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-AcLys-VC-PABC-0101; 4) antibody-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-AcLys-VC-PABC-MMAD; 5) antibody -GLLQGG (SEQ ID NO: 78)-AcLys-VC-PABC-0101; and 6) antibody-GLLQGG (SEQ ID NO: 78)-AcLys-VC-PABC-MMAD. In some embodiments, the conjugate comprises an amino acid substitution from lysine to arginine at position 222. In some embodiments, the conjugate comprises an amino acid lysine (K) deletion at the C-terminus of the heavy chain of the antibody.

In another aspect, the invention provides a conjugate of the antibody or the antigen binding fragment as described herein, the conjugate comprises amino acid substitutions at positions N297Q and K222R, a linker comprising amino-PEG6-propionyl, and a cytotoxic agent (e.g., MMAD or other auristatins).

5 In another aspect, the invention provides a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of the Trop-2 antibody or the conjugate as described herein and a pharmaceutically acceptable carrier.

10 In another aspect, the invention provides an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding the Trop-2 antibody as described herein. In some embodiments, provided is a vector comprising the polynucleotide.

In another aspect, the invention provides an isolated host cell that recombinantly produces the Trop-2 antibody as described herein.

15 In another aspect, the invention provides a method for treating a condition associated with Trop-2 expression in a subject comprising administering to the subject in need thereof an effective amount of the pharmaceutical composition as described herein. In some embodiments, the condition is a cancer. In some embodiments, the cancer is selected from the group consisting of bladder, breast, cervical, choriocarcinoma, colon, esophageal, gastric, glioblastoma, head and neck, kidney, lung, oral, ovarian, pancreatic, prostate cancer, and skin cancer.

20 In another aspect, the invention provides a method of inhibiting tumor growth or progression in a subject who has a Trop-2 expressing tumor, comprising administering to the subject in need thereof an effective amount of the pharmaceutical composition as described herein.

25 In another aspect, the invention provides a method of inhibiting metastasis of Trop-2 expressing cancer cells in a subject, comprising administering to the subject in need thereof an effective amount of the pharmaceutical composition as described herein.

30 In another aspect, the invention provides a method of inducing tumor regression in a subject who has a Trop-2 expressing tumor, comprising administering to the subject in need thereof an effective amount of the pharmaceutical composition as described herein.

In some embodiments, the antibody or the conjugate as described herein can be administered parenterally in an individual. In some embodiments, the individual is a human.

In some embodiments, the antibody described herein does not comprise a heavy chain variable region of the sequence QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGST DYNALMSRLSINKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARDGDYDRYTMDYWGGT SVTVSS (SEQ ID NO: 2) and a light chain variable region of the sequence DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLE SGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 1).

Brief Description of the Figures/Drawings

Figure 1 depicts *in vivo* efficacy studies of various Trop-2 mouse antibodies (7E6, 15E2, and 18B1) in target-expressing Colo205 xenograft model.

Figure 2A depicts *in vivo* efficacy studies of various Trop-2 mouse antibodies (7E6, 15E2, and 18B1) in target-expressing A431 xenograft model.

Figure 2B depicts inhibition of A431 Xenograft tumor growth by Trop-2 antibody 7E6 in a dose-response study.

Figure 2C depicts inhibition of A431 Xenograft tumor growth by Trop-2 antibodies 6G11, 7E6, and 18B1 in A431 xenograft model.

Figure 3 depicts the ADCC activity of chimeric and humanized Trop-2 7E6 antibodies in A431 cells. 7E6 corresponds to the chimeric Trop-2 7E6 antibody (e.g., antibody comprising SEQ ID NOs: 2 and 3), h7E6-WT corresponds to an antibody comprising SEQ ID NOs: 4 and 3, h7E6-SVG corresponds to an antibody comprising SEQ ID NOs: 5 and 3, h7E6-L corresponds to an antibody comprising SEQ ID NOs: 4 and 6, h7E6-SVGL corresponds to an antibody comprising SEQ ID NOs: 5 and 6, and anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) corresponds to a positive control antibody.

Figure 4 depicts the amino acid sequence alignment between human Trop-1 (SEQ ID NO: 29) and human Trop-2 (SEQ ID NO: 27), and the consensus sequence (SEQ ID NO: 69).

Figure 5 depicts the amino acid sequence alignment between human Trop-2 (SEQ ID NO: 27) and mouse Trop-2 (SEQ ID NO: 28), and the consensus sequence (SEQ ID NO: 70).

Figure 6A depicts the amino acid sequence alignment of the heavy chain variable regions of Trop-2 antibodies h7E6 (SEQ ID NO: 4), h7E6_SVG (SEQ ID NO: 5), and m7E6 (SEQ ID NO: 2), and their consensus sequence (SEQ ID NO: 71).

Figure 6B depicts the amino acid sequence alignment of the light chain variable regions of Trop-2 antibodies h7E6_VL (SEQ ID NO: 3), h7E6_VL_L (SEQ ID NO: 6), h7E6_VL_N (SEQ ID NO: 7), and m7E6_VL (SEQ ID NO: 1), and their consensus sequence (SEQ ID NO: 72).

Figure 7A depicts the amino acid sequence alignment of the heavy chain variable regions of Trop-2 antibodies h6G11 (SEQ ID NO: 11), h6G11_FKG_SF (SEQ ID NO: 13), and m6G11 (SEQ ID NO: 9), and their consensus sequence (SEQ ID NO: 73).

Figure 7B depicts the amino acid sequence alignment of the light chain variable regions of Trop-2 antibodies h6G11 (SEQ ID NO: 10), h6G11_FKG_SF (SEQ ID NO: 12), and m6G11 (SEQ ID NO: 8), and their consensus sequence (SEQ ID NO: 74).

Figure 8 depicts that chimeric (7E6) Trop-2 antibody conjugated to AcLys-vc-PABC-MMAD induced long term tumor regression in BxPC3 Xenograft model. AcLys-vc-PABC-MMAD corresponds to Acetyl-Lysine-Valine-Citrulline-*p*-aminobenzyloxycarbonyl- Monomethyl Auristatin D. LCQ03 and TG6 correspond to glutamine-containing transglutaminase tags SEQ ID NOs:78 and 79, respectively. NNC-TG1-vcMMAD represents control antibody conjugated to glutamine-containing transglutaminase tag (SEQ ID NO: 75) and vcMMAD.

Figure 9A depicts that humanized (h7E6SVG) Trop-2 antibody conjugated to vc0101 induced tumor regression in pancreatic tumor BxPC3 xenograft model. Vc0101 corresponds to AcLys-vc-PABC-0101 (Acetyl-Lysine-valine-citrulline-*p*-aminobenzyloxycarbonyl-(2-methylalanyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-[(1*S*)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)ethyl]amino]propyl]pyrrolidin-1-yl]-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamide). TG6 corresponds to glutamine-containing transglutaminase tag SEQ ID NO:79.

Figure 9B depicts that humanized (h7E6SVG) Trop-2 antibody having amino acid substitutions at positions 297 and 222 and conjugated to PEG6-MMAD induced tumor

regression in pancreatic tumor BxPC3 xenograft model. PEG6-MMAD corresponds to (Propylene Glycol)₆-propionyl-MMAD.

Figure 9C depicts that humanized (h7E6SVG) Trop-2 antibody having amino acid substitution at position 222 and conjugated to vc0101 induced tumor regression in pancreatic tumor BxPC3 xenograft model. LCQ04 corresponds to glutamine-containing transglutaminase tag SEQ ID NO: 79. vc0101 corresponds to AcLys-vc-PABC-0101.

Figure 10 depicts that humanized (h7E6SVG) Trop-2 antibody conjugated to vc0101 induced tumor regression in colorectal tumor Colo205 xenograft model. TG6 and LCQ03 correspond to glutamine-containing transglutaminase tags SEQ ID NOs: 79 and 78, respectively.

Figure 11 depicts that humanized (h7E6SVG) Trop-2 antibody conjugated to vc0101 induced tumor regression in Ovarian PDX Ova196756 xenograft model. TG6 corresponds to glutamine-containing transglutaminase tag SEQ ID NO: 79.

Figure 12A shows that humanized (h7E6SVG) Trop-2 antibody conjugated to vc0101 has superior efficacy than gemcitabine to induce tumor regression in Pan0146 pancreatic PDX model. TG6 corresponds to glutamine-containing transglutaminase tag SEQ ID NO: 79 (same as in Figure 12B).

Figure 12B shows that continuous dosing of humanized (h7E6SVG) Trop-2 antibody conjugated to vc0101 resulted in sustained tumor regression in pancreatic PDX Pan0146 xenograft model.

Figure 13 shows that that a single dose of the humanized anti-Trop2 antibody conjugated with PEG6-MMAD induced tumor regression in pancreatic Pan144607 PDX model.

Figure 14 shows that a single dose of the humanized anti-Trop2 antibody conjugated with PEG6-MMAD induced tumor regression in pancreatic Pan0135 PDX model.

Detailed Description

The invention disclosed herein provides antibodies and antibody conjugates (e.g., antibody-drug conjugates) that specifically bind to Trop-2 (e.g., human Trop-2). The invention also provides polynucleotides encoding these antibodies, compositions comprising these antibodies, and methods of making and using these antibodies. The

invention also provides methods for treating a condition associated with Trop-2 expression in a subject, such as cancer (e.g., colon, gastric, head and neck, lung, ovarian, and pancreatic cancer).

5 General Techniques

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology (including recombinant techniques), microbiology, cell biology, biochemistry and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature, such as, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Definitions

30 An "antibody" is an immunoglobulin molecule capable of specific binding to a target, such as a carbohydrate, polynucleotide, lipid, polypeptide, etc., through at least one antigen recognition site, located in the variable region of the immunoglobulin

molecule. As used herein, the term encompasses not only intact polyclonal or monoclonal antibodies, but also fragments thereof (such as Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), single chain (ScFv) and domain antibodies (including, for example, shark and camelid antibodies), and fusion proteins comprising an antibody, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site. An antibody includes an antibody of any class, such as IgG, IgA, or IgM (or sub-class thereof), and the antibody need not be of any particular class. Depending on the antibody amino acid sequence of the constant region of its heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2. The heavy-chain constant regions that correspond to the different classes of immunoglobulins are called alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

The term "antigen binding fragment" or "antigen binding portion" of an antibody, as used herein, refers to one or more fragments of an intact antibody that retain the ability to specifically bind to a given antigen (e.g., Trop-2). Antigen binding functions of an antibody can be performed by fragments of an intact antibody. Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen binding fragment" of an antibody include Fab; Fab'; F(ab')₂; an Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; an Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody; a single domain antibody (dAb) fragment (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), and an isolated complementarity determining region (CDR).

An antibody, an antibody conjugate, or a polypeptide that "preferentially binds" or "specifically binds" (used interchangeably herein) to a target (e.g., Trop-2 protein) is a term well understood in the art, and methods to determine such specific or preferential binding are also well known in the art. A molecule is said to exhibit "specific binding" or "preferential binding" if it reacts or associates more frequently, more rapidly, with greater duration and/or with greater affinity with a particular cell or substance than it does with alternative cells or substances. An antibody "specifically binds" or "preferentially binds" to a target if it binds with greater affinity, avidity, more readily, and/or with greater

duration than it binds to other substances. For example, an antibody that specifically or preferentially binds to a Trop-2 epitope is an antibody that binds this epitope with greater affinity, avidity, more readily, and/or with greater duration than it binds to other Trop-2 epitopes or non-Trop-2 epitopes. It is also understood that by reading this definition, for example, an antibody (or moiety or epitope) that specifically or preferentially binds to a first target may or may not specifically or preferentially bind to a second target. As such, “specific binding” or “preferential binding” does not necessarily require (although it can include) exclusive binding. Generally, but not necessarily, reference to binding means preferential binding.

A “variable region” of an antibody refers to the variable region of the antibody light chain or the variable region of the antibody heavy chain, either alone or in combination. As known in the art, the variable regions of the heavy and light chain each consist of four framework regions (FR) connected by three complementarity determining regions (CDRs) also known as hypervariable regions. The CDRs in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen binding site of antibodies. There are at least two techniques for determining CDRs: (1) an approach based on cross-species sequence variability (i.e., Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); and (2) an approach based on crystallographic studies of antigen-antibody complexes (Al-lazikani et al., 1997, J. Molec. Biol. 273:927-948). As used herein, a CDR may refer to CDRs defined by either approach or by a combination of both approaches.

A “CDR” of a variable domain are amino acid residues within the variable region that are identified in accordance with the definitions of the Kabat, Chothia, the accumulation of both Kabat and Chothia, AbM, contact, and/or conformational definitions or any method of CDR determination well known in the art. Antibody CDRs may be identified as the hypervariable regions originally defined by Kabat et al. See, e.g., Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. The positions of the CDRs may also be identified as the structural loop structures originally described by Chothia and others. See, e.g., Chothia et al., Nature 342:877-883, 1989. Other approaches to CDR identification include the “AbM definition,” which is a compromise between Kabat and Chothia and is

derived using Oxford Molecular's AbM antibody modeling software (now Accelrys®), or the "contact definition" of CDRs based on observed antigen contacts, set forth in MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745, 1996. In another approach, referred to herein as the "conformational definition" of CDRs, the positions of the CDRs may be identified as the residues that make enthalpic contributions to antigen binding. See, e.g., Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166, 2008. Still other CDR boundary definitions may not strictly follow one of the above approaches, but will nonetheless overlap with at least a portion of the Kabat CDRs, although they may be shortened or lengthened in light of prediction or experimental findings that particular residues or groups of residues or even entire CDRs do not significantly impact antigen binding. As used herein, a CDR may refer to CDRs defined by any approach known in the art, including combinations of approaches. The methods used herein may utilize CDRs defined according to any of these approaches. For any given embodiment containing more than one CDR, the CDRs may be defined in accordance with any of Kabat, Chothia, extended, AbM, contact, and/or conformational definitions.

As used herein, "monoclonal antibody" refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations, which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler and Milstein, Nature 256:495, 1975, or may be made by recombinant DNA methods such as described in U.S. Pat. No. 4,816,567. The monoclonal antibodies may also be isolated from phage libraries generated using the techniques described in McCafferty et al., Nature 348:552-554, 1990, for example.

As used herein, "humanized" antibody refers to forms of non-human (e.g. murine) antibodies that are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains, or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen binding subsequences of antibodies) that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin.

5 Preferably, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are
10 replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, the humanized antibody may comprise residues that are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences, but are included to further refine and optimize antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of
15 the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region or domain (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Preferred are antibodies having Fc regions modified as described in
20 WO 99/58572. Other forms of humanized antibodies have one or more CDRs (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, or CDR H3) which are altered with respect to the original antibody, which are also termed one or more CDRs "derived from" one or more CDRs from the original antibody.

As used herein, "human antibody" means an antibody having an amino acid
25 sequence corresponding to that of an antibody produced by a human and/or which has been made using any of the techniques for making human antibodies known to those skilled in the art or disclosed herein. This definition of a human antibody includes antibodies comprising at least one human heavy chain polypeptide or at least one human light chain polypeptide. One such example is an antibody comprising murine
30 light chain and human heavy chain polypeptides. Human antibodies can be produced using various techniques known in the art. In one embodiment, the human antibody is selected from a phage library, where that phage library expresses human antibodies

(Vaughan et al., Nature Biotechnology, 14:309-314, 1996; Sheets et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381, 1991; Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581, 1991). Human antibodies can also be made by immunization of animals into which human immunoglobulin loci have been
5 transgenically introduced in place of the endogenous loci, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. This approach is described in U.S. Pat. Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016. Alternatively, the human antibody may be prepared by immortalizing human B lymphocytes that produce an antibody directed against a target
10 antigen (such B lymphocytes may be recovered from an individual or from single cell cloning of the cDNA, or may have been immunized *in vitro*). See, e.g., Cole et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77, 1985; Boerner et al., J. Immunol., 147 (1):86-95, 1991; and U.S. Pat. No. 5,750,373.

The term "chimeric antibody" is intended to refer to antibodies in which the
15 variable region sequences are derived from one species and the constant region sequences are derived from another species, such as an antibody in which the variable region sequences are derived from a mouse antibody and the constant region sequences are derived from a human antibody.

The terms "polypeptide", "oligopeptide", "peptide" and "protein" are used
20 interchangeably herein to refer to chains of amino acids of any length, preferably, relatively short (e.g., 10-100 amino acids). The chain may be linear or branched, it may comprise modified amino acids, and/or may be interrupted by non-amino acids. The terms also encompass an amino acid chain that has been modified naturally or by intervention; for example, disulfide bond formation, glycosylation, lipidation, acetylation,
25 phosphorylation, or any other manipulation or modification, such as conjugation with a labeling component. Also included within the definition are, for example, polypeptides containing one or more analogs of an amino acid (including, for example, unnatural amino acids, etc.), as well as other modifications known in the art. It is understood that the polypeptides can occur as single chains or associated chains.

30 A "monovalent antibody" comprises one antigen binding site per molecule (e.g., IgG or Fab). In some instances, a monovalent antibody can have more than one antigen binding sites, but the binding sites are from different antigens.

A “bivalent antibody” comprises two antigen binding sites per molecule (e.g., IgG). In some instances, the two binding sites have the same antigen specificities. However, bivalent antibodies may be bispecific.

5 A “bispecific,” “dual-specific” or “bifunctional” antibody is a hybrid antibody having two different antigen binding sites. The two antigen binding sites of a bispecific antibody bind to two different epitopes, which may reside on the same or different protein targets.

Antibodies of the invention can be produced using techniques well known in the art, e.g., recombinant technologies, phage display technologies, synthetic technologies or combinations of such technologies or other technologies readily known in the art
10 (see, for example, Jayasena, S.D., Clin. Chem., 45: 1628-50, 1999 and Fellouse, F.A., et al, J. Mol. Biol., 373(4):924-40, 2007).

As known in the art, “polynucleotide,” or “nucleic acid,” as used interchangeably herein, refer to chains of nucleotides of any length, and include DNA and RNA. The nucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, modified nucleotides or
15 bases, and/or their analogs, or any substrate that can be incorporated into a chain by DNA or RNA polymerase. A polynucleotide may comprise modified nucleotides, such as methylated nucleotides and their analogs. If present, modification to the nucleotide structure may be imparted before or after assembly of the chain. The sequence of nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. A polynucleotide may
20 be further modified after polymerization, such as by conjugation with a labeling component. Other types of modifications include, for example, “caps”, substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, internucleotide modifications such as, for example, those with uncharged linkages (e.g., methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoamidates, carbamates, etc.) and with charged
25 linkages (e.g., phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.), those containing pendant moieties, such as, for example, proteins (e.g., nucleases, toxins, antibodies, signal peptides, poly-L-lysine, etc.), those with intercalators (e.g., acridine, psoralen, etc.), those containing chelators (e.g., metals, radioactive metals, boron, oxidative metals, etc.), those containing alkylators, those with modified linkages (e.g., alpha anomeric
30 nucleic acids, etc.), as well as unmodified forms of the polynucleotide(s). Further, any of the hydroxyl groups ordinarily present in the sugars may be replaced, for example, by phosphonate groups, phosphate groups, protected by standard protecting groups, or

activated to prepare additional linkages to additional nucleotides, or may be conjugated to solid supports. The 5' and 3' terminal OH can be phosphorylated or substituted with amines or organic capping group moieties of from 1 to 20 carbon atoms. Other hydroxyls may also be derivatized to standard protecting groups. Polynucleotides can also contain analogous forms of ribose or deoxyribose sugars that are generally known in the art, including, for example, 2'-O-methyl-, 2'-O-allyl, 2'-fluoro- or 2'-azido-ribose, carbocyclic sugar analogs, alpha- or beta-anomeric sugars, epimeric sugars such as arabinose, xyloses or lyxoses, pyranose sugars, furanose sugars, sedoheptuloses, acyclic analogs and abasic nucleoside analogs such as methyl riboside. One or more phosphodiester linkages may be replaced by alternative linking groups. These alternative linking groups include, but are not limited to, embodiments wherein phosphate is replaced by P(O)S("thioate"), P(S)S ("dithioate"), (O)NR₂ ("amidate"), P(O)R, P(O)OR', CO or CH₂ ("formacetal"), in which each R or R' is independently H or substituted or unsubstituted alkyl (1-20 C) optionally containing an ether (-O-) linkage, aryl, alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl or araldyl. Not all linkages in a polynucleotide need be identical. The preceding description applies to all polynucleotides referred to herein, including RNA and DNA.

As known in the art a "constant region" of an antibody refers to the constant region of the antibody light chain or the constant region of the antibody heavy chain, either alone or in combination.

As used herein, "substantially pure" refers to material which is at least 50% pure (i.e., free from contaminants), more preferably, at least 90% pure, more preferably, at least 95% pure, yet more preferably, at least 98% pure, and most preferably, at least 99% pure.

A "host cell" includes an individual cell or cell culture that can be or has been a recipient for vector(s) for incorporation of polynucleotide inserts. Host cells include progeny of a single host cell, and the progeny may not necessarily be completely identical (in morphology or in genomic DNA complement) to the original parent cell due to natural, accidental, or deliberate mutation. A host cell includes cells transfected in vivo with a polynucleotide(s) of this invention.

As known in the art, the term "Fc region" is used to define a C-terminal region of an immunoglobulin heavy chain. The "Fc region" may be a native sequence Fc region

or a variant Fc region. Although the boundaries of the Fc region of an immunoglobulin heavy chain might vary, the human IgG heavy chain Fc region is usually defined to stretch from an amino acid residue at position Cys226, or from Pro230, to the carboxyl-terminus thereof. The numbering of the residues in the Fc region is that of the EU index
5 as in Kabat. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. The Fc region of an immunoglobulin generally comprises two constant regions, CH2 and CH3.

As used in the art, "Fc receptor" and "FcR" describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The preferred FcR is a native sequence human FcR.
10 Moreover, a preferred FcR is one which binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the FcγRI, FcγRII, and FcγRIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. FcγRII receptors include FcγRIIA (an "activating receptor") and FcγRIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof.
15 FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92, 1991; Capel et al., Immunomethods, 4:25-34, 1994; and de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41, 1995. "FcR" also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer et al., J. Immunol., 117:587, 1976; and Kim et al., J. Immunol., 24:249, 1994).

20 The term "compete", as used herein with regard to an antibody, means that a first antibody, or an antigen binding fragment (or portion) thereof, binds to an epitope in a manner sufficiently similar to the binding of a second antibody, or an antigen binding portion thereof, such that the result of binding of the first antibody with its cognate epitope is detectably decreased in the presence of the second antibody compared to the
25 binding of the first antibody in the absence of the second antibody. The alternative, where the binding of the second antibody to its epitope is also detectably decreased in the presence of the first antibody, can, but need not be the case. That is, a first antibody can inhibit the binding of a second antibody to its epitope without that second antibody inhibiting the binding of the first antibody to its respective epitope. However,
30 where each antibody detectably inhibits the binding of the other antibody with its cognate epitope or ligand, whether to the same, greater, or lesser extent, the antibodies are said to "cross-compete" with each other for binding of their respective epitope(s).

Both competing and cross-competing antibodies are encompassed by the present invention. Regardless of the mechanism by which such competition or cross-competition occurs (e.g., steric hindrance, conformational change, or binding to a common epitope, or portion thereof), the skilled artisan would appreciate, based upon
5 the teachings provided herein, that such competing and/or cross-competing antibodies are encompassed and can be useful for the methods disclosed herein.

A “functional Fc region” possesses at least one effector function of a native sequence Fc region. Exemplary “effector functions” include C1q binding; complement dependent cytotoxicity; Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated
10 cytotoxicity; phagocytosis; down-regulation of cell surface receptors (e.g. B cell receptor), etc. Such effector functions generally require the Fc region to be combined with a binding domain (e.g. an antibody variable domain) and can be assessed using various assays known in the art for evaluating such antibody effector functions.

A “native sequence Fc region” comprises an amino acid sequence identical to the
15 amino acid sequence of an Fc region found in nature. A “variant Fc region” comprises an amino acid sequence which differs from that of a native sequence Fc region by virtue of at least one amino acid modification, yet retains at least one effector function of the native sequence Fc region. In some embodiments, the variant Fc region has at least one amino acid substitution compared to a native sequence Fc region or to the Fc
20 region of a parent polypeptide, e.g. from about one to about ten amino acid substitutions, and preferably, from about one to about five amino acid substitutions in a native sequence Fc region or in the Fc region of the parent polypeptide. The variant Fc region herein will preferably possess at least about 80% sequence identity with a native sequence Fc region and/or with an Fc region of a parent polypeptide, and most
25 preferably, at least about 90% sequence identity therewith, more preferably, at least about 95%, at least about 96%, at least about 97%, at least about 98%, at least about 99% sequence identity therewith.

The term “effector function” refers to the biological activities attributable to the Fc region of an antibody. Examples of antibody effector functions include, but are not
30 limited to, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), Fc receptor binding, complement dependent cytotoxicity (CDC), phagocytosis, C1q binding, and down regulation of cell surface receptors (e.g., B cell receptor; BCR). See, e.g., U.S. Pat No.

6,737,056. Such effector functions generally require the Fc region to be combined with a binding domain (e.g., an antibody variable domain) and can be assessed using various assays known in the art for evaluating such antibody effector functions. An exemplary measurement of effector function is through Fcγ3 and/or C1q binding.

5 As used herein “antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity” or “ADCC” refers to a cell-mediated reaction in which nonspecific cytotoxic cells that express Fc receptors (FcRs) (e.g. natural killer (NK) cells, neutrophils, and macrophages) recognize bound antibody on a target cell and subsequently cause lysis of the target cell. ADCC activity of a molecule of interest can be assessed using an *in vitro* ADCC assay, such as that
10 described in U.S. Patent No. 5,500,362 or 5,821,337. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and NK cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, e.g., in an animal model such as that disclosed in Clynes et al., 1998, *PNAS (USA)*, 95:652-656.

15 “Complement dependent cytotoxicity” or “CDC” refers to the lysing of a target in the presence of complement. The complement activation pathway is initiated by the binding of the first component of the complement system (C1q) to a molecule (e.g. an antibody) complexed with a cognate antigen. To assess complement activation, a CDC assay, e.g. as described in Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202: 163
20 (1996), may be performed.

 As used herein, “treatment” is an approach for obtaining beneficial or desired clinical results. For purposes of this invention, beneficial or desired clinical results include, but are not limited to, one or more of the following: reducing the proliferation of (or destroying) neoplastic or cancerous cells, inhibiting metastasis of neoplastic cells,
25 shrinking or decreasing the size of Trop-2 expressing tumor, remission of a Trop-2 associated disease (e.g., cancer), decreasing symptoms resulting from a Trop-2 associated disease (e.g., cancer), increasing the quality of life of those suffering from a Trop-2 associated disease (e.g., cancer), decreasing the dose of other medications required to treat a Trop-2 associated disease (e.g., cancer), delaying the progression of
30 a Trop-2 associated disease (e.g., cancer), curing a Trop-2 associated disease (e.g., cancer), and/or prolong survival of patients having a Trop-2 associated disease (e.g., cancer).

“Ameliorating” means a lessening or improvement of one or more symptoms as compared to not administering a Trop-2 antibody or a Trop-2 antibody conjugate. “Ameliorating” also includes shortening or reduction in duration of a symptom.

As used herein, an “effective dosage” or “effective amount” of drug, compound, or pharmaceutical composition is an amount sufficient to effect any one or more beneficial or desired results. For prophylactic use, beneficial or desired results include eliminating or reducing the risk, lessening the severity, or delaying the outset of the disease, including biochemical, histological and/or behavioral symptoms of the disease, its complications and intermediate pathological phenotypes presenting during development of the disease. For therapeutic use, beneficial or desired results include clinical results such as reducing incidence or amelioration of one or more symptoms of various Trop-2 associated diseases or conditions (such as gastric, head and neck, lung, ovarian, and pancreatic cancers), decreasing the dose of other medications required to treat the disease, enhancing the effect of another medication, and/or delaying the progression of the Trop-2 associated disease of patients. An effective dosage can be administered in one or more administrations. For purposes of this invention, an effective dosage of drug, compound, or pharmaceutical composition is an amount sufficient to accomplish prophylactic or therapeutic treatment either directly or indirectly. As is understood in the clinical context, an effective dosage of a drug, compound, or pharmaceutical composition may or may not be achieved in conjunction with another drug, compound, or pharmaceutical composition. Thus, an “effective dosage” may be considered in the context of administering one or more therapeutic agents, and a single agent may be considered to be given in an effective amount if, in conjunction with one or more other agents, a desirable result may be or is achieved.

An “individual” or a “subject” is a mammal, more preferably, a human. Mammals also include, but are not limited to, farm animals, sport animals, pets, primates, horses, dogs, cats, mice and rats.

As used herein, “vector” means a construct, which is capable of delivering, and, preferably, expressing, one or more gene(s) or sequence(s) of interest in a host cell. Examples of vectors include, but are not limited to, viral vectors, naked DNA or RNA expression vectors, plasmid, cosmid or phage vectors, DNA or RNA expression vectors

associated with cationic condensing agents, DNA or RNA expression vectors encapsulated in liposomes, and certain eukaryotic cells, such as producer cells.

As used herein, "expression control sequence" means a nucleic acid sequence that directs transcription of a nucleic acid. An expression control sequence can be a promoter, such as a constitutive or an inducible promoter, or an enhancer. The expression control sequence is operably linked to the nucleic acid sequence to be transcribed.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" or "pharmaceutical acceptable excipient" includes any material which, when combined with an active ingredient, allows the ingredient to retain biological activity and is non-reactive with the subject's immune system. Examples include, but are not limited to, any of the standard pharmaceutical carriers such as a phosphate buffered saline solution, water, emulsions such as oil/water emulsion, and various types of wetting agents. Preferred diluents for aerosol or parenteral administration are phosphate buffered saline (PBS) or normal (0.9%) saline. Compositions comprising such carriers are formulated by well known conventional methods (see, for example, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; and Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005).

The term "acyl donor glutamine-containing tag" or "glutamine tag" as used herein refers to a polypeptide or a protein containing one or more Gln residue(s) that acts as a transglutaminase amine acceptor. See, e.g., WO2012059882.

The term " k_{on} ", as used herein, refers to the rate constant for association of an antibody to an antigen. Specifically, the rate constants (k_{on} and k_{off}) and equilibrium dissociation constants are measured using Fab antibody fragments (i.e. monovalent) and Trop-2 proteins (e.g., Trop-2-Fc fusion protein).

The term " k_{off} ", as used herein, refers to the rate constant for dissociation of an antibody from the antibody/antigen complex.

The term " K_D ", as used herein, refers to the equilibrium dissociation constant of an antibody-antigen interaction.

Reference to "about" a value or parameter herein includes (and describes) embodiments that are directed to that value or parameter per se. For example,

description referring to "about X" includes description of "X." Numeric ranges are inclusive of the numbers defining the range.

It is understood that wherever embodiments are described herein with the language "comprising," otherwise analogous embodiments described in terms of
5 "consisting of" and/or "consisting essentially of" are also provided.

Where aspects or embodiments of the invention are described in terms of a Markush group or other grouping of alternatives, the present invention encompasses not only the entire group listed as a whole, but each member of the group individually and all possible subgroups of the main group, but also the main group absent one or more of
10 the group members. The present invention also envisages the explicit exclusion of one or more of any of the group members in the claimed invention.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. In case of conflict, the present specification, including definitions, will
15 control. Throughout this specification and claims, the word "comprise," or variations such as "comprises" or "comprising" will be understood to imply the inclusion of a stated integer or group of integers but not the exclusion of any other integer or group of integers. Unless otherwise required by context, singular terms shall include pluralities and plural terms shall include the singular.

20 Exemplary methods and materials are described herein, although methods and materials similar or equivalent to those described herein can also be used in the practice or testing of the present invention. The materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

25 Trop-2 Antibodies and Methods of Making Thereof

The present invention provides an antibody that binds to Trop-2. In one aspect, the invention provides an isolated antibody, or an antigen binding fragment thereof, which specifically binds to domain 3 (e.g., amino acid residues 153-206) and domain 4 (e.g., amino acid residues 209-273) of human Trop-2 (e.g., SEQ ID NO:27) with a
30 monovalent antibody binding affinity (K_D) of 6.5 nM or less as measured by surface plasmon resonance. In another aspect, the invention provides an isolated antibody, or an antigen binding fragment thereof, which specifically binds to domain 1 (e.g., amino

acid residues 27-70) of human Trop-2 (e.g., SEQ ID NO:27) with a binding affinity (K_D) of about 35 nM or less as measured by surface plasmon resonance.

The antibodies and antibody conjugates of the invention are characterized by any one or more of the following characteristics: (a) bind to Trop-2; (b) decrease or downregulate the protein expression of Trop-2; (c) treat, prevent, ameliorate one or more symptoms of a condition associated with Trop-2 expression in a subject (e.g., cancer, such as gastric, head and neck, lung, ovarian, or pancreatic cancer); (d) inhibit tumor growth or progression in a subject (who has a Trop-2 expressing tumor); (e) inhibit metastasis of Trop-2 expressing cancer cells in a subject (who has one or more Trop-2 expressing cancer cells); (f) induce regression (e.g., long-term regression) of a Trop-2 expressing tumor; (g) exert cytotoxic activity in Trop-2 expressing cells; (h) deactivate or downregulate the ERK1/2 MAPK pathway; and (i) block Trop-2 interaction with other yet to be identified factors.

The antibodies useful in the present invention can encompass monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, antibody fragments (e.g., Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), chimeric antibodies, bispecific antibodies, heteroconjugate antibodies, single chain (ScFv), mutants thereof, fusion proteins comprising an antibody portion (e.g., a domain antibody), humanized antibodies, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site of the required specificity, including glycosylation variants of antibodies, amino acid sequence variants of antibodies, and covalently modified antibodies. The antibodies may be murine, rat, human, or any other origin (including chimeric or humanized antibodies).

In some embodiments, the Trop-2 antibody as described herein is a monoclonal antibody. For example, the Trop-2 antibody is a humanized monoclonal antibody or a chimeric monoclonal antibody.

In some embodiments, the antibody comprises a modified constant region, such as, for example without limitation, a constant region that has increased potential for provoking an immune response. For example, the constant region may be modified to have increased affinity to an Fc gamma receptor such as, e.g., FcγRI, FcγRIIA, or FcγIII.

In some embodiments, the antibody comprises a modified constant region, such as a constant region that is immunologically inert, that is, having a reduced potential for

provoking an immune response. In some embodiments, the constant region is modified as described in Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999; PCT Application No. PCT/GB99/01441; and/or UK Patent Application No. 98099518. The Fc can be human IgG1, human IgG2, human IgG3, or human IgG4. The Fc can be human IgG2
5 containing the mutation A330P331 to S330S331 (IgG2Δa), in which the amino acid residues are numbered with reference to the wild type IgG2 sequence. Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999. In some embodiments, the antibody comprises a constant region of IgG₄ comprising the following mutations (Armour et al., Molecular Immunology 40 585-593, 2003): E233F234L235 to P233V234A235 (IgG4Δc), in which
10 the numbering is with reference to wild type IgG4. In yet another embodiment, the Fc is human IgG4 E233F234L235 to P233V234A235 with deletion G236 (IgG4Δb). In another embodiment, the Fc is any human IgG4 Fc (IgG4, IgG4Δb or IgG4Δc) containing hinge stabilizing mutation S228 to P228 (Aalberse et al., Immunology 105, 9-19, 2002). In another embodiment, the Fc can be aglycosylated Fc.

15 In some embodiments, the constant region is aglycosylated by mutating the oligosaccharide attachment residue (such as Asn297) and/or flanking residues that are part of the glycosylation recognition sequence in the constant region. In some embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation enzymatically. The constant region may be aglycosylated for N-linked glycosylation
20 enzymatically or by expression in a glycosylation deficient host cell.

One way of determining binding affinity of antibodies to Trop-2 is by measuring binding affinity of monofunctional Fab fragments of the antibody. To obtain monofunctional Fab fragments, an antibody (for example, IgG) can be cleaved with papain or expressed recombinantly. The affinity of a Trop-2 Fab fragment of an
25 antibody can be determined by surface plasmon resonance (Biacore™3000™ surface plasmon resonance (SPR) system, Biacore™, INC, Piscataway NJ) equipped with pre-immobilized streptavidin sensor chips (SA) or anti-mouse Fc or anti-human Fc using HBS-EP running buffer (0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15 NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20). Biotinylated or Fc fusion human Trop-2 can be diluted into HBS-EP
30 buffer to a concentration of less than 0.5 µg/mL and injected across the individual chip channels using variable contact times, to achieve two ranges of antigen density, either 50-200 response units (RU) for detailed kinetic studies or 800-1,000 RU for screening

assays. Regeneration studies have shown that 25 mM NaOH in 25% v/v ethanol effectively removes the bound Fab while keeping the activity of Trop-2 on the chip for over 200 injections. Typically, serial dilutions (spanning concentrations of 0.1-10x estimated K_D) of purified Fab samples are injected for 1 min at 100 μ L/minute and dissociation times of up to 2 hours are allowed. The concentrations of the Fab proteins are determined by ELISA and/or SDS-PAGE electrophoresis using a Fab of known concentration (as determined by amino acid analysis) as a standard. Kinetic association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are obtained simultaneously by fitting the data globally to a 1:1 Langmuir binding model (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) using the BIAevaluation program. Equilibrium dissociation constant (K_D) values are calculated as k_{off}/k_{on} . This protocol is suitable for use in determining binding affinity of an antibody to any Trop-2, including human Trop-2, Trop-2 of another mammal (such as mouse Trop-2, rat Trop-2, or primate Trop-2), as well as different forms of Trop-2 (e.g., glycosylated Trop-2). Binding affinity of an antibody is generally measured at 25°C, but can also be measured at 37°C.

The Trop-2 antibodies as described herein may be made by any method known in the art. For the production of hybridoma cell lines, the route and schedule of immunization of the host animal are generally in keeping with established and conventional techniques for antibody stimulation and production, as further described herein. General techniques for production of human and mouse antibodies are known in the art and/or are described herein.

It is contemplated that any mammalian subject including humans or antibody producing cells therefrom can be manipulated to serve as the basis for production of mammalian, including human and hybridoma cell lines. Typically, the host animal is inoculated intraperitoneally, intramuscularly, orally, subcutaneously, intraplantar, and/or intradermally with an amount of immunogen, including as described herein.

Hybridomas can be prepared from the lymphocytes and immortalized myeloma cells using the general somatic cell hybridization technique of Kohler, B. and Milstein, C., *Nature* 256:495-497, 1975 or as modified by Buck, D. W., et al., *In Vitro*, 18:377-381, 1982. Available myeloma lines, including but not limited to X63-Ag8.653 and those from the Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA, may be used in the

hybridization. Generally, the technique involves fusing myeloma cells and lymphoid cells using a fusogen such as polyethylene glycol, or by electrical means well known to those skilled in the art. After the fusion, the cells are separated from the fusion medium and grown in a selective growth medium, such as hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) medium, to eliminate unhybridized parent cells. Any of the media described herein, supplemented with or without serum, can be used for culturing hybridomas that secrete monoclonal antibodies. As another alternative to the cell fusion technique, EBV immortalized B cells may be used to produce the Trop-2 monoclonal antibodies of the subject invention. The hybridomas are expanded and subcloned, if desired, and supernatants are assayed for anti-immunogen activity by conventional immunoassay procedures (e.g., radioimmunoassay, enzyme immunoassay, or fluorescence immunoassay).

Hybridomas that may be used as source of antibodies encompass all derivatives, progeny cells of the parent hybridomas that produce monoclonal antibodies specific for Trop-2, or a portion thereof.

Hybridomas that produce such antibodies may be grown *in vitro* or *in vivo* using known procedures. The monoclonal antibodies may be isolated from the culture media or body fluids, by conventional immunoglobulin purification procedures such as ammonium sulfate precipitation, gel electrophoresis, dialysis, chromatography, and ultrafiltration, if desired. Undesired activity, if present, can be removed, for example, by running the preparation over adsorbents made of the immunogen attached to a solid phase and eluting or releasing the desired antibodies off the immunogen. Immunization of a host animal with a human Trop-2, or a fragment containing the target amino acid sequence conjugated to a protein that is immunogenic in the species to be immunized, e.g., keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor using a bifunctional or derivatizing agent, for example, maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride, SOCl_2 , or $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, where R and R^1 are different alkyl groups, can yield a population of antibodies (e.g., monoclonal antibodies).

If desired, the Trop-2 antibody (monoclonal or polyclonal) of interest may be sequenced and the polynucleotide sequence may then be cloned into a vector for

expression or propagation. The sequence encoding the antibody of interest may be maintained in vector in a host cell and the host cell can then be expanded and frozen for future use. Production of recombinant monoclonal antibodies in cell culture can be carried out through cloning of antibody genes from B cells by means known in the art.

5 See, e.g. Tiller et al., J. Immunol. Methods 329, 112, 2008; U.S. Pat. No. 7,314,622.

In an alternative, the polynucleotide sequence may be used for genetic manipulation to "humanize" the antibody or to improve the affinity, or other characteristics of the antibody. For example, the constant region may be engineered to more nearly resemble human constant regions to avoid immune response if the
10 antibody is used in clinical trials and treatments in humans. It may be desirable to genetically manipulate the antibody sequence to obtain greater affinity to Trop-2 and greater efficacy in inhibiting Trop-2.

There are four general steps to humanize a monoclonal antibody. These are: (1) determining the nucleotide and predicted amino acid sequence of the starting antibody
15 light and heavy variable domains (2) designing the humanized antibody, i.e., deciding which antibody framework region to use during the humanizing process (3) the actual humanizing methodologies/techniques and (4) the transfection and expression of the humanized antibody. See, for example, U.S. Pat. Nos. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; and 6,180,370.

20 A number of "humanized" antibody molecules comprising an antigen binding site derived from a non-human immunoglobulin have been described, including chimeric antibodies having rodent or modified rodent V regions and their associated CDRs fused to human constant regions. See, for example, Winter et al. Nature 349:293-299, 1991, Lobuglio et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224, 1989, Shaw et al. J Immunol.
25 138:4534-4538, 1987, and Brown et al. Cancer Res. 47:3577-3583, 1987. Other references describe rodent CDRs grafted into a human supporting framework region (FR) prior to fusion with an appropriate human antibody constant region. See, for example, Riechmann et al. Nature 332:323-327, 1988, Verhoeyen et al. Science 239:1534-1536, 1988, and Jones et al. Nature 321:522-525, 1986. Another reference
30 describes rodent CDRs supported by recombinantly engineered rodent framework regions. See, for example, European Patent Publication No. 0519596. These "humanized" molecules are designed to minimize unwanted immunological response

toward rodent anti-human antibody molecules which limits the duration and effectiveness of therapeutic applications of those moieties in human recipients. For example, the antibody constant region can be engineered such that it is immunologically inert (e.g., does not trigger complement lysis). See, e.g. PCT Publication No. 5 PCT/GB99/01441; UK Patent Application No. 9809951.8. Other methods of humanizing antibodies that may also be utilized are disclosed by Daugherty et al., Nucl. Acids Res. 19:2471-2476, 1991, and in U.S. Pat. Nos. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; 5,866,692; 6,210,671; and 6,350,861; and in PCT Publication No. WO 01/27160.

10 The general principles related to humanized antibodies discussed above are also applicable to customizing antibodies for use, for example, in dogs, cats, primate, equines and bovines. Further, one or more aspects of humanizing an antibody described herein may be combined, e.g., CDR grafting, framework mutation and CDR mutation.

15 In one variation, fully human antibodies may be obtained by using commercially available mice that have been engineered to express specific human immunoglobulin proteins. Transgenic animals that are designed to produce a more desirable (e.g., fully human antibodies) or more robust immune response may also be used for generation of humanized or human antibodies. Examples of such technology are Xenomouse™ from Abgenix, Inc. (Fremont, CA) and HuMAb-Mouse® and TC Mouse™ from Medarex, Inc. 20 (Princeton, NJ).

In an alternative, antibodies may be made recombinantly and expressed using any method known in the art. In another alternative, antibodies may be made recombinantly by phage display technology. See, for example, U.S. Pat. Nos. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; and 6,265,150; and Winter et al., Annu. Rev. 25 Immunol. 12:433-455, 1994. Alternatively, the phage display technology (McCafferty et al., Nature 348:552-553, 1990) can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. According to this technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous 30 bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties

of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the B cell. Phage display can be performed in a variety of formats; for review see, e.g., Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571, 1993. Several
5 sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson et al., *Nature* 352:624-628, 1991, isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated
10 essentially following the techniques described by Mark et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991, or Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734, 1993. In a natural immune response, antibody genes accumulate mutations at a high rate (somatic hypermutation). Some of the changes introduced will confer higher affinity, and B cells displaying high-affinity surface immunoglobulin are preferentially replicated and differentiated during
15 subsequent antigen challenge. This natural process can be mimicked by employing the technique known as "chain shuffling." (Marks et al., *Bio/Technol.* 10:779-783, 1992). In this method, the affinity of "primary" human antibodies obtained by phage display can be improved by sequentially replacing the heavy and light chain V region genes with repertoires of naturally occurring variants (repertoires) of V domain genes obtained from
20 unimmunized donors. This technique allows the production of antibodies and antibody fragments with affinities in the pM-nM range. A strategy for making very large phage antibody repertoires (also known as "the mother-of-all libraries") has been described by Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266, 1993. Gene shuffling can also be used to derive human antibodies from rodent antibodies, where the human antibody has
25 similar affinities and specificities to the starting rodent antibody. According to this method, which is also referred to as "epitope imprinting", the heavy or light chain V domain gene of rodent antibodies obtained by phage display technique is replaced with a repertoire of human V domain genes, creating rodent-human chimeras. Selection on antigen results in isolation of human variable regions capable of restoring a functional
30 antigen binding site, i.e., the epitope governs (imprints) the choice of partner. When the process is repeated in order to replace the remaining rodent V domain, a human antibody is obtained (see PCT Publication No. WO 93/06213). Unlike traditional

humanization of rodent antibodies by CDR grafting, this technique provides completely human antibodies, which have no framework or CDR residues of rodent origin.

Antibodies may be made recombinantly by first isolating the antibodies and antibody producing cells from host animals, obtaining the gene sequence, and using the
5 gene sequence to express the antibody recombinantly in host cells (e.g., CHO cells). Another method which may be employed is to express the antibody sequence in plants (e.g., tobacco) or transgenic milk. Methods for expressing antibodies recombinantly in plants or milk have been disclosed. See, for example, Peeters, et al. Vaccine 19:2756, 2001; Lonberg, N. and D. Huszar Int. Rev. Immunol 13:65, 1995; and Pollock, et al., J
10 Immunol Methods 231:147, 1999. Methods for making derivatives of antibodies, e.g., humanized, single chain, etc. are known in the art.

Immunoassays and flow cytometry sorting techniques such as fluorescence activated cell sorting (FACS) can also be employed to isolate antibodies that are specific for Trop-2.

15 The antibodies as described herein can be bound to many different carriers. Carriers can be active and/or inert. Examples of well-known carriers include polypropylene, polystyrene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, glass, natural and modified celluloses, polyacrylamides, agaroses, and magnetite. The nature of the carrier can be either soluble or insoluble for purposes of the invention. Those skilled in
20 the art will know of other suitable carriers for binding antibodies, or will be able to ascertain such, using routine experimentation. In some embodiments, the carrier comprises a moiety that targets the myocardium.

DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of
25 binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of the monoclonal antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors (such as expression vectors disclosed in PCT Publication No. WO 87/04462), which are then transfected into host cells such as E. coli cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or
30 myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. See, e.g., PCT Publication No. WO 87/04462. The DNA also may be modified, for example, by

substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant regions in place of the homologous murine sequences, Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, 1984, or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. In that manner,
5 “chimeric” or “hybrid” antibodies are prepared that have the binding specificity of a Trop-2 monoclonal antibody herein.

The Trop-2 antibodies as described herein can be identified or characterized using methods known in the art, whereby reduction of Trop-2 expression levels is detected and/or measured. In some embodiments, a Trop-2 antibody is identified by
10 incubating a candidate agent with Trop-2 and monitoring binding and/or attendant reduction of Trop-2 expression levels. The binding assay may be performed with purified Trop-2 polypeptide(s), or with cells naturally expressing, or transfected to express, Trop-2 polypeptide(s). In one embodiment, the binding assay is a competitive binding assay, where the ability of a candidate antibody to compete with a known Trop-2
15 antibody for Trop-2 binding is evaluated. The assay may be performed in various formats, including the ELISA format.

Following initial identification, the activity of a candidate Trop-2 antibody can be further confirmed and refined by bioassays, known to test the targeted biological activities. Alternatively, bioassays can be used to screen candidates directly. Some of
20 the methods for identifying and characterizing Trop-2 antibodies are described in detail in the Examples.

Trop-2 antibodies may be characterized using methods well known in the art. For example, one method is to identify the epitope to which it binds, or “epitope mapping.” There are many methods known in the art for mapping and characterizing the location of
25 epitopes on proteins, including solving the crystal structure of an antibody-antigen complex, competition assays, gene fragment expression assays, and synthetic peptide-based assays, as described, for example, in Chapter 11 of Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. In an additional example, epitope mapping can be used to
30 determine the sequence to which a Trop-2 antibody binds. Epitope mapping is commercially available from various sources, for example, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, The Netherlands). The epitope can be a linear

epitope, i.e., contained in a single stretch of amino acids, or a conformational epitope formed by a three-dimensional interaction of amino acids that may not necessarily be contained in a single stretch. Peptides of varying lengths (e.g., at least 4-6 amino acids long) can be isolated or synthesized (e.g., recombinantly) and used for binding assays with a Trop-2 antibody. In another example, the epitope to which the Trop-2 antibody binds can be determined in a systematic screening by using overlapping peptides derived from the Trop-2 sequence and determining binding by the Trop-2 antibody. According to the gene fragment expression assays, the open reading frame encoding Trop-2 is fragmented either randomly or by specific genetic constructions and the reactivity of the expressed fragments of Trop-2 with the antibody to be tested is determined. The gene fragments may, for example, be produced by PCR and then transcribed and translated into protein in vitro, in the presence of radioactive amino acids. The binding of the antibody to the radioactively labeled Trop-2 fragments is then determined by immunoprecipitation and gel electrophoresis. Certain epitopes can also be identified by using large libraries of random peptide sequences displayed on the surface of phage particles (phage libraries). Alternatively, a defined library of overlapping peptide fragments can be tested for binding to the test antibody in simple binding assays. In an additional example, mutagenesis of an antigen binding domain, domain swapping experiments and alanine scanning mutagenesis can be performed to identify residues required, sufficient, and/or necessary for epitope binding. For example, domain swapping experiments can be performed using a mutant Trop-2 in which various fragments of the Trop-2 protein have been replaced (swapped) with sequences from Trop-2 from another species (e.g., mouse), or a closely related, but antigenically distinct protein (e.g., Trop-1). By assessing binding of the antibody to the mutant Trop-2, the importance of the particular Trop-2 fragment to antibody binding can be assessed.

Yet another method which can be used to characterize a Trop-2 antibody is to use competition assays with other antibodies known to bind to the same antigen, i.e., various fragments on Trop-2, to determine if the Trop-2 antibody binds to the same epitope as other antibodies. Competition assays are well known to those of skill in the art.

An expression vector can be used to direct expression of a Trop-2 antibody. One skilled in the art is familiar with administration of expression vectors to obtain expression

of an exogenous protein in vivo. See, e.g., U.S. Pat. Nos. 6,436,908; 6,413,942; and 6,376,471. Administration of expression vectors includes local or systemic administration, including injection, oral administration, particle gun or catheterized administration, and topical administration. In another embodiment, the expression
5 vector is administered directly to the sympathetic trunk or ganglion, or into a coronary artery, atrium, ventricle, or pericardium.

Targeted delivery of therapeutic compositions containing an expression vector, or subgenomic polynucleotides can also be used. Receptor-mediated DNA delivery techniques are described in, for example, Findeis et al., Trends Biotechnol., 1993,
10 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer, J.A. Wolff, ed., 1994; Wu et al., J. Biol. Chem., 263:621, 1988; Wu et al., J. Biol. Chem., 269:542, 1994; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3655, 1990; and Wu et al., J. Biol. Chem., 266:338, 1991. Therapeutic compositions containing a polynucleotide are administered in a range of about 100 ng to about 200 mg of DNA for
15 local administration in a gene therapy protocol. Concentration ranges of about 500 ng to about 50 mg, about 1 µg to about 2 mg, about 5 µg to about 500 µg, and about 20 µg to about 100 µg of DNA can also be used during a gene therapy protocol. The therapeutic polynucleotides and polypeptides can be delivered using gene delivery vehicles. The gene delivery vehicle can be of viral or non-viral origin (see generally,
20 Jolly, Cancer Gene Therapy, 1:51, 1994; Kimura, Human Gene Therapy, 5:845, 1994; Connelly, Human Gene Therapy, 1995, 1:185; and Kaplitt, Nature Genetics, 6:148, 1994). Expression of such coding sequences can be induced using endogenous mammalian or heterologous promoters. Expression of the coding sequence can be either constitutive or regulated.

25 Viral-based vectors for delivery of a desired polynucleotide and expression in a desired cell are well known in the art. Exemplary viral-based vehicles include, but are not limited to, recombinant retroviruses (see, e.g., PCT Publication Nos. WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; U.S. Pat. Nos. 5, 219,740 and 4,777,127; GB Pat. No. 2,200,651; and EP
30 Pat. No. 0 345 242), alphavirus-based vectors (e.g., Sindbis virus vectors, Semliki forest virus (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), Ross River virus (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) and Venezuelan equine encephalitis virus (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR

1249; ATCC VR-532)), and adeno-associated virus (AAV) vectors (see, e.g., PCT Publication Nos. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 and WO 95/00655). Administration of DNA linked to killed adenovirus as described in Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147 can also be employed.

5 Non-viral delivery vehicles and methods can also be employed, including, but not limited to, polycationic condensed DNA linked or unlinked to killed adenovirus alone (see, e.g., Curiel, Hum. Gene Ther., 3:147, 1992); ligand-linked DNA (see, e.g., Wu, J. Biol. Chem., 264:16985, 1989); eukaryotic cell delivery vehicles cells (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,814,482; PCT Publication Nos. WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; 10 and WO 97/42338) and nucleic charge neutralization or fusion with cell membranes. Naked DNA can also be employed. Exemplary naked DNA introduction methods are described in PCT Publication No. WO 90/11092 and U.S. Pat. No. 5,580,859. Liposomes that can act as gene delivery vehicles are described in U.S. Pat. No. 5,422,120; PCT Publication Nos. WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; and 15 EP 0524968. Additional approaches are described in Philip, Mol. Cell Biol., 14:2411, 1994 and in Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci., 91:1581, 1994.

In some embodiments, the invention encompasses compositions, including pharmaceutical compositions, comprising antibodies described herein or made by the methods and having the characteristics described herein. As used herein, compositions 20 comprise one or more antibodies that bind to Trop-2, and/or one or more polynucleotides comprising sequences encoding one or more these antibodies. These compositions may further comprise suitable excipients, such as pharmaceutically acceptable excipients including buffers, which are well known in the art.

Accordingly, the invention provides any of the following, or compositions 25 (including pharmaceutical compositions) comprising any of the following: (a) an antibody having a partial light chain sequence of

a)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPLLIYLASNLE
SGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPTYFGGGTKLEIK (SEQ ID

30 NO: 1),

- 38 -

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPTYFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 3),

5 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSLYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPTYFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 6),

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSNYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPTYFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 7),

10 DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQTIGTSIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNSWPFTFGSGGTKLEIK (SEQ ID NO: 8),
GVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTIGTSIHWYQQKPGQAPRLLIYYASESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQSNSWPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 10), or

15 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTIGTSIHWYQQKPGQAPRLLIYYASESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCSQSFSWPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 12)
and/or (b) an antibody having a partial heavy chain sequence of

QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGSTDYNSALMSRLSINKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARDGDYDRYTMDYWGQGT
20 SVTVSS (SEQ ID NO: 2),

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGSTDYNSALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGDYDRYTMDYWGQGT
TVSS (SEQ ID NO: 4),

25 QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWTSGVTDYNSALMGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGDYDRYTMDYWGQGT
TVSS (SEQ ID NO: 5),

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPGHGLEWIGNIYPSDSYSNYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQVSSPTSEDSAVYYCTYGSSFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 9),

30 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLEWMGNIYPSDSYSNYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGSSFDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 11), or

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLEWMGNIFPSDS
YSNYNKKFKDRVMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGSGFDYWGGTLTV
SS (SEQ ID NO: 13).

5 Table 1

mAb	Light Chain	Heavy Chain
m7E6	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR <u>ASKSVSTSGYSYMH</u> WYQQKPG QPPKLLIY <u>LASNLES</u> GVPARFSG SGSGTDFTLNHPVEEEDAATYY <u>CQHSRELPTY</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 1)	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTV <u>SGFSLT</u> <u>SYGV</u> HWVRQPPGKGLE WLG <u>VIWTGG</u> STDYNSALMSRLSIN KDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMY YCARD <u>DGDYDRYTMDY</u> WGQGTSV TVSS (SEQ ID NO: 2)
h7E6	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>RASKSVSTSGYSYMH</u> WYQQKP GQPPKLLIY <u>LASNLES</u> GVPDRFS GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY YC <u>CQHSRELPTY</u> FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 3)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV <u>SGGSISSY</u> GVHWIRQPPGKGLEWI G <u>VIWTGG</u> STDYNSALMSRVTVISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA <u>RDGDYDRYTMDY</u> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 4)
h7E6_ SVG	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>RASKSVSTSGYSYMH</u> WYQQKP GQPPKLLIY <u>LASNLES</u> GVPDRFS GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY YC <u>CQHSRELPTY</u> FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 3)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV <u>SGGSISSY</u> GVHWIRQPPGKGLEWI G <u>VIWTSGV</u> TDYNSALMGRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA <u>RDGDYDRYTMDY</u> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 5)
h7E6_ SVG1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>RASKSVSTSGYSYMH</u> WYQQKP GQPPKLLIY <u>LASNLES</u> GVPDRFS GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY YC <u>CQHSRELPTY</u> FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 3)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV <u>SGGSISSY</u> GVHWIRQPPGKGLEWI G <u>VIWTSGV</u> TDYNSALMGRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA <u>RX₁X₂DYDRYTX₃DY</u> WGQGTLTV SS wherein X ₁ , X ₂ , and X ₃ are any naturally occurring amino acids

mAb	Light Chain	Heavy Chain
		(SEQ ID NO: 84)
h7E6_ SVG2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>RASKSVSTSGYSYMH</u> WYQQKP GQPPKLLIY <u>LASNLES</u> GVPDRFS GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY YC <u>QHSRELPTY</u> FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 3)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV <u>SGGSISSYGVHWIRQPPGKGLEWI</u> <u>GVIWTS</u> GVTDYNSALMGRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA <u>RX₁X₂DYDRYTX₃DY</u> WGQGTLLTV SS wherein X ₁ and X ₂ are any naturally occurring amino acids; X ₃ is E or M (SEQ ID NO: 85)
h7E6_ SVGL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>RASKSVSTSLYSYMH</u> WYQQKPG QPPKLLIY <u>LASNLES</u> GVPDRFSG SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYY <u>CQHSRELPTY</u> FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 6)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV <u>SGGSISSYGVHWIRQPPGKGLEWI</u> <u>GVIWTS</u> GVTDYNSALMGRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA <u>RDGDYDRYTMDY</u> WGQGTLLTVS S (SEQ ID NO: 5)
h7E6_ SVGN	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>RASKSVSTSNYSYMH</u> WYQQKP GQPPKLLIY <u>LASNLES</u> GVPDRFS GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY YC <u>QHSRELPTY</u> FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 7)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV <u>SGGSISSYGVHWIRQPPGKGLEWI</u> <u>GVIWTS</u> GVTDYNSALMGRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA <u>RDGDYDRYTMDY</u> WGQGTLLTVS S (SEQ ID NO: 5)
m6G11	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSC <u>R</u> <u>ASQTIGTSIH</u> WYQQRTNGSPRLLI <u>KYASESIS</u> GIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVESEDIADYYC <u>QQSNSW</u> <u>PFT</u> FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 8)	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCK <u>ASGYTFTSY</u> WINWVKQRPGHGLE WIGNI <u>YPSDSYS</u> SNYNQKF <u>DK</u> KATL TVDKSSSTAYMQVSSPTSEDSAV YYCTY <u>GSSF</u> DYWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 9)
h6G11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>R</u>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK

mAb	Light Chain	Heavy Chain
	<u>ASQTIGTSIH</u> WYQQKPGQAPRL I <u>YASESIS</u> GIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQSNSW</u> <u>PFT</u> FGQGKLEIK (SEQ ID NO: 10)	ASGYT <u>FTSY</u> WINWVRQAPGQGLE WMGNI <u>PSDSY</u> SNYNQKFKDRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR <u>GSSFDY</u> WGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO: 11)
H6G11 _FKG_ SF	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>R</u> <u>ASQTIGTSIH</u> WYQQKPGQAPRL I <u>YASESIS</u> GIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYC <u>SQSFSW</u> <u>PFT</u> FGQGKLEIK (SEQ ID NO: 12)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYT <u>FTSY</u> WINWVRQAPGQGLE WMGNI <u>PSDSY</u> SNYNKKFKDRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR <u>GSGFDY</u> WGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO: 13)

In Table 1, the underlined sequences are CDR sequences according to Kabat and in bold according to Chothia.

The invention also provides CDR portions of antibodies to Trop-2 (including
5 Chothia, Kabat CDRs, and CDR contact regions). Determination of CDR regions is well within the skill of the art. It is understood that in some embodiments, CDRs can be a combination of the Kabat and Chothia CDR (also termed "combined CRs" or "extended CDRs"). In some embodiments, the CDRs are the Kabat CDRs. In other embodiments, the CDRs are the Chothia CDRs. In other words, in embodiments with more than one
10 CDR, the CDRs may be any of Kabat, Chothia, combination CDRs, or combinations thereof. Table 2 provides examples of CDR sequences provided herein.

Table 2

Heavy Chain			
mAb	CDRH1	CDRH2	CDRH3
m7E6	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GFSLTSY (SEQ ID NO: 31) (Chothia); GFSLTSYGVH (SEQ	VIWTGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 33) (Kabat) WTGGS (SEQ ID NO: 34) (Chothia)	DGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 35)

	ID NO: 32) (extended)		
h7E6	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTGGSTDYNSALMS (SEQ ID NO: 33) (Kabat) WTGGS (SEQ ID NO: 34) (Chothia)	DGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 35)
h7E6_ SVG	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 35)
h7E6_ SVG1	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	$X_1X_2DYDRYTX_3D$ Y wherein X_1 , X_2 , and X_3 are any naturally occurring amino acids (SEQ ID NO: 86)
h7E6_ SVG2	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	$X_1X_2DYDRYTX_3D$ Y wherein X_1 and X_2 are any naturally occurring amino acids; wherein X_3 is E or M (SEQ ID NO: 87)
h7E6_	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG	DYDRYTX ₁ DY

SVG3	30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	(SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	wherein X ₁ is any naturally occurring amino acid; (SEQ ID NO: 83)
h7E6_ SVG4	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	DYDRYTX ₁ DY wherein X ₁ is E or M (SEQ ID NO: 82)
h7E6_ SVG5	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	LGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 103)
h7E6_ SVG6	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	YGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 104)
h7E6_ SVG7	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	FGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 105)

	ID NO: 37) (extended)		
h7E6_ SVG8	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	HGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 106)
h7E6_ SVG9	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	AGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 107)
h7E6_ SVG10	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	TGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 108)
h7E6_ SVG11	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	SGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 109)
h7E6_ SVG12	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat);	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat)	IGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 110)

	GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	
h7E6_ SVG13	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	RGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 111)
h7E6_ SVG14	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	VGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 112)
h7E6_ SVG15	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	WGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 113)
h7E6_ SVG16	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	QGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 114)

	(extended)		
h7E6_ SVG17	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	GGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 115)
h7E6_ SVG18	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	KGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 116)
h7E6_ SVG19	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DSDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 117)
h7E6_ SVG20	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DKDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 118)
h7E6_ SVG21	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DHDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 119)

	NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	(Chothia)	
h7E6_ SVG22	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	DADYDRYTMDY (SEQ ID NO: 120)
h7E6_ SVG23	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	DFDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 121)
h7E6_ SVG24	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	DTDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 122)
h7E6_ SVG25	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	DRDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 123)

h7E6_ SVG26	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DVDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 124)
h7E6_ SVG27	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DQDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 125)
h7E6_ SVG28	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DLDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 126)
h7E6_ SVG29	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DYDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 127)
h7E6_ SVG30	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia);	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DEDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 128)

	GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)		
h7E6_ SVG31	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DNDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 129)
h7E6_ SVG32	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DWDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 130)
h7E6_ SVGL	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 35)
h7E6_ SVGL1	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DSDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 117)
h7E6_	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO: 39) (Chothia)	DKDYDRYTMDY

SVGL2	30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	(SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	(SEQ ID NO: 118)
h7E6_ SVGL3	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	DADYDRYTMDY (SEQ ID NO: 120)
h7E6_ SVGL4	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	DLDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 126)
h7E6_ SVGL5	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37) (extended)	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	DEDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 128)
h7E6_ SVGN	SYGVH (SEQ ID NO: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ	VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) (Kabat) WTSGV (SEQ ID NO:39) (Chothia)	DGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 35)

	ID NO: 37) (extended)		
h7E6 Heavy Chain Conse nsus	GX ₁ SX ₂ X ₃ SY wherein X ₁ is F or G; X ₂ is L or I; X ₃ is T or S (SEQ ID NO: 76) (Chothia); GX ₁ SX ₂ X ₃ SYGVH wherein X ₁ is F or G; X ₂ is L or I; X ₃ is T or S (SEQ ID NO: 77)	VIWTX ₁ GX ₂ TDYNSALMX ₃ wherein X ₁ is G or S; X ₂ is S or V; X ₃ is S or G (SEQ ID NO: 49) (Kabat) WTX ₁ GX ₂ wherein X ₁ is G or S; X ₂ is S or V (SEQ ID NO: 50) (Chothia)	X ₁ X ₂ DYDRYTX ₃ D Y wherein X ₁ , X ₂ , and X ₃ are any naturally occurring amino acids (SEQ ID NO: 86) X ₁ X ₂ DYDRYTX ₃ D Y wherein X ₁ and X ₂ , are any naturally occurring amino acids; wherein X ₃ is E or M (SEQ ID NO: 87) DYDRYTX ₁ DY wherein X ₁ is any naturally occurring amino acid; (SEQ ID NO: 83) DYDRYTX ₁ DY wherein X ₁ is E or M (SEQ ID NO: 82)
m6G11	SYWIN (SEQ ID NO: 40) (Kabat); GYTFTSY (SEQ ID NO: 41) (Chothia); GYTFTSYWIN (SEQ ID NO: 42) (extended)	NIYPSDSYSNYNQKFKD (SEQ ID NO: 43) (Kabat) YPSDSY (SEQ ID NO: 44) (Chothia)	GSSF DY (SEQ ID NO: 45)
h6G11	SYWIN (SEQ ID NO:	NIYPSDSYSNYNQKFKD	GSSF DY (SEQ ID

	40) (Kabat); GYTFTSY (SEQ ID NO: 41) (Chothia); GYTFTSYWIN (SEQ ID NO: 42) (extended)	(SEQ ID NO: 43) (Kabat) YPSDSY (SEQ ID NO: 44) (Chothia)	NO: 45)
h6G11_FKG_SF	SYWIN (SEQ ID NO: 40) (Kabat); GYTFTSY (SEQ ID NO: 41) (Chothia); GYTFTSYWIN (SEQ ID NO: 42) (extended)	NIFPSDSYSNYNKKFKD (SEQ ID NO: 46) (Kabat) FPSDSY (SEQ ID NO: 47) (Chothia)	GSGFDY (SEQ ID NO: 48)
h6G11 Heavy Chain consensus		NIX ₁ PSDSYSNYNX ₂ KFKD wherein X ₁ is Y or F; X ₂ is Q or K (SEQ ID NO: 51) (Kabat) X ₁ PSDSY wherein X ₁ is Y or F (SEQ ID NO: 52) (Chothia)	GSX ₁ FDY wherein X ₁ is S or G (SEQ ID NO: 53)
Light Chain			
mAb	CDRL1	CDRL2	CDRL3
m7E6	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO: 54)	LASNLES (SEQ ID NO: 55)	QHSRELPYT (SEQ ID NO: 56)
h7E6	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO: 54)	LASNLES (SEQ ID NO: 55)	QHSRELPYT (SEQ ID NO: 56)
h7E6_SVG (including h7E6_SVG1 through h	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO: 54)	LASNLES (SEQ ID NO: 55)	QHSRELPYT (SEQ ID NO: 56)

h7E6_ SVG32			
h7E6_ SVGL (includi ng h7E6_ SVGL1 throug h h7E6_ SVGL5	RASKSVSTSLYSYMH (SEQ ID NO: 57)	LASNLES (SEQ ID NO: 55)	QHSRELPYT (SEQ ID NO: 56)
h7E6_ SVGN	RASKSVSTSNYSYMH (SEQ ID NO: 58)	LASNLES (SEQ ID NO: 55)	QHSRELPYT (SEQ ID NO: 56)
h7E6 Light Chain Conse nsus	RASKSVSTSX ₁ YSYMH wherein X ₁ is G, L, or N (SEQ ID NO: 63)		
m6G11	RASQTIGTSIH (SEQ ID NO: 59)	YASESIS (SEQ ID NO: 60)	QQSNSWPFT (SEQ ID NO: 61)
h6G11	RASQTIGTSIH (SEQ ID NO: 59)	YASESIS (SEQ ID NO: 60)	QQSNSWPFT (SEQ ID NO: 61)
h6G11 _FKG_ SF	RASQTIGTSIH (SEQ ID NO: 59)	YASESIS (SEQ ID NO: 60)	SQSFSWPFT (SEQ ID NO: 62)
h6G11 Light Chain consen sus			X ₁ QX ₂ SWPFT wherein X ₁ is Q or S; X ₂ is N or F (SEQ ID NO:64)

- 54 -

In some embodiments, the present invention provides an antibody that binds to Trop-2 and competes with the antibody as described herein, such as m7E6, h7E6, h7E6_SVG, h7E6_SVG1, h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6, h7E6_SVG7, h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11, h7E6_SVG12, h7E6_SVG13, h7E6_SVG14, h7E6_SVG15, h7E6_SVG16, h7E6_SVG17, h7E6_SVG18, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23, h7E6_SVG24, h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27, h7E6_SVG28, h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31, h7E6_SVG32, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h7E6_SVGN, m6G11, h6G11, or h6G11_FKG_SF. In some embodiments, the antibody competes the binding of Trop-2 with antibody h7E6_SVG, h7E6_SVG4, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG22, h7E6_SVG28, h7E6_SVG30, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h7E6_SVGN, or h6G11_FKG_SF. In some

embodiments, the antibody competes the binding of Trop-2 with antibody h7E6_SVG and has a monovalent antibody binding affinity (K_D) of about any of or less than about any of 6.5 nM, 6.0 nM, 5.5 nM, 5.0 nM, 4.5 nM, 4.0 nM, 3.5 nM, 3.0 nM, 2.5 nM, 2.0 nM, 1.5 nM, 1.0 nM, 0.5 nM, or 0.25 nM as measured by surface plasmon resonance. In some embodiments, the antibody competes with the binding of Trop-2 with antibody h7E6 and has a monovalent antibody binding affinity (K_D) of about any of or less than about any of 30 nM, 25 nM, 22 nM, 20 nM, 15 nM, or 10 nM. In some embodiments, the competing antibody does not comprise a heavy chain variable region of the sequence QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGST DYNALMSRLSINKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARDGDYDRYTMDYWGQGT SVTVSS (SEQ ID NO: 2) and a light chain variable region of the sequence DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLASNLE SGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 1). In some embodiments, the competing antibody is not antibody AR47A6.4.2, AR52A301.5, AR36A36.11.1, BR110 or RS7.

In some embodiments, the present invention provides an antibody or an antigen binding fragment, which specifically bind to Trop-2, wherein the antibody comprises a VH region comprising a sequence shown in SEQ ID NO: 5, 84, or 85; and/or a VL region

- 55 -

comprising a sequence shown in SEQ ID NO: 3. In some embodiments, the antibody comprises a light chain comprising the sequence
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPPKLLIYLASNL
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPYTFGQGTKLEIKRTVAAP
5 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 66)

and a heavy chain comprising the sequence
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWTSGVTD
YNSALMGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGDYDRYTM DYWGQGT
10 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
15 FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 65).

In some embodiments, the antibody comprises a light chain comprising the sequence SEQ ID NO: 66 and a heavy chain comprising the sequence SEQ ID NO: 101 or 102.

In some embodiments, the present invention provides an antibody or an antigen binding fragment, which specifically bind to Trop-2, wherein the antibody comprises a
20 VH region comprising a sequence shown in SEQ ID NO: 13; and/or a VL region comprising a sequence shown in SEQ ID NO: 12. In some embodiments, the antibody comprises a light chain comprising the sequence
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTIGTSIHWYQQKPGQAPRLLIYYASESISGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCSQSFSWPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
25 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 68) and a heavy chain comprising the sequence
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLEWMGNIFPSDS
YSNYNKKFKDRVMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARGSGFDYWGQGT
30 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

- 56 -

KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 67).

In some embodiments, the invention also provides CDR portions of antibodies to
5 Trop-2 antibodies based on CDR contact regions. CDR contact regions are regions of
an antibody that imbue specificity to the antibody for an antigen. In general, CDR
contact regions include the residue positions in the CDRs and Vernier zones which are
constrained in order to maintain proper loop structure for the antibody to bind a specific
antigen. See, e.g., Makabe et al., J. Biol. Chem., 283:1156-1166, 2007. Determination
10 of CDR contact regions is well within the skill of the art.

The binding affinity (K_D) of the Trop-2 antibody as described herein to Trop-2
(such as human Trop-2) can be about 0.002 to about 200 nM. In some embodiments,
the binding affinity is any of about 200 nM, about 100 nM, about 50 nM, about 45 nM,
about 40 nM, about 35 nM, about 30 nM, about 25 nM, about 20 nM, about 15 nM,
15 about 10 nM, about 8 nM, about 7.5 nM, about 7 nM, about 6.5 nM, about 6 nM, about
5.5 nM, about 5 nM, about 4 nM, about 3 nM, about 2 nM, about 1 nM, about 500 pM,
about 100 pM, about 60 pM, about 50 pM, about 20 pM, about 15 pM, about 10 pM,
about 5 pM, or about 2 pM. In some embodiments, the binding affinity is less than any
of about 250 nM, about 200 nM, about 100 nM, about 50 nM, about 30 nM, about 20
20 nM, about 10 nM, about 7.5 nM, about 7 nM, about 6.5 nM, about 6 nM, about 5 nM,
about 4.5 nM, about 4 nM, about 3.5 nM, about 3 nM, about 2.5 nM, about 2 nM, about
1.5 nM, about 1 nM, about 500 pM, about 100 pM, about 50 pM, about 20 pM, about 10
pM, about 5 pM, or about 2 pM.

In some embodiments, the binding affinity (e.g., monovalent antibody binding) of
25 the antibodies as described herein is about 35 nM or less as measured by surface
plasmon resonance. In some embodiments, the binding affinity (e.g., monovalent
antibody binding) of the antibodies as described herein is about 6.5 nM or less as
measured by surface plasmon resonance.

The invention also provides methods of making any of these antibodies. The
30 antibodies of this invention can be made by procedures known in the art. The
polypeptides can be produced by proteolytic or other degradation of the antibodies, by
recombinant methods (i.e., single or fusion polypeptides) as described above or by

chemical synthesis. Polypeptides of the antibodies, especially shorter polypeptides up to about 50 amino acids, are conveniently made by chemical synthesis. Methods of chemical synthesis are known in the art and are commercially available. For example, an antibody could be produced by an automated polypeptide synthesizer employing the solid phase method. See also, U.S. Pat. Nos. 5,807,715; 4,816,567; and 6,331,415.

In another alternative, the antibodies can be made recombinantly using procedures that are well known in the art. In one embodiment, a polynucleotide comprises a sequence encoding the heavy chain and/or the light chain variable regions of antibody m7E6, h7E6, h7E6_SVG, h7E6_SVG1, h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6, h7E6_SVG7, h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11, h7E6_SVG12, h7E6_SVG13, h7E6_SVG14, h7E6_SVG15, h7E6_SVG16, h7E6_SVG17, h7E6_SVG18, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23, h7E6_SVG24, h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27, h7E6_SVG28, h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31, h7E6_SVG32, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h7E6_SVGN, m6G11, h6G11, or h6G11_FKG_SF. The sequence encoding the antibody of interest may be maintained in a vector in a host cell and the host cell can then be expanded and frozen for future use. Vectors (including expression vectors) and host cells are further described herein.

The invention also encompasses scFv of antibodies of this invention. Single chain variable region fragments are made by linking light and/or heavy chain variable regions by using a short linking peptide (Bird et al., Science 242:423-426, 1988). An example of a linking peptide is (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 80), which bridges approximately 3.5 nm between the carboxy terminus of one variable region and the amino terminus of the other variable region. Linkers of other sequences have been designed and used (Bird et al., 1988, supra). Linkers should be short, flexible polypeptides and preferably comprised of less than about 20 amino acid residues. Linkers can in turn be modified for additional functions, such as attachment of drugs or attachment to solid supports. The single chain variants can be produced either recombinantly or synthetically. For synthetic production of scFv, an automated synthesizer can be used. For recombinant production of scFv, a suitable plasmid

containing polynucleotide that encodes the scFv can be introduced into a suitable host cell, either eukaryotic, such as yeast, plant, insect or mammalian cells, or prokaryotic, such as *E. coli*. Polynucleotides encoding the scFv of interest can be made by routine manipulations such as ligation of polynucleotides. The resultant scFv can be isolated
5 using standard protein purification techniques known in the art.

Other forms of single chain antibodies, such as diabodies or minibodies are also encompassed. Diabodies are bivalent, bispecific antibodies in which heavy chain variable (VH) and light chain variable (VL) domains are expressed on a single polypeptide chain, but using a linker that is too short to allow for pairing between the two
10 domains on the same chain, thereby forcing the domains to pair with complementary domains of another chain and creating two antigen binding sites (see e.g., Holliger, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993; Poljak, R. J., et al., *Structure* 2:1121-1123, 1994). Minibody includes the VL and VH domains of a native antibody fused to the hinge region and CH3 domain of the immunoglobulin molecule. See, e.g.,
15 US5,837,821.

For example, bispecific antibodies, monoclonal antibodies that have binding specificities for at least two different antigens, can be prepared using the antibodies disclosed herein. Methods for making bispecific antibodies are known in the art (see, e.g., Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210, 1986). Traditionally, the
20 recombinant production of bispecific antibodies was based on the coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, with the two heavy chains having different specificities (Millstein and Cuello, *Nature* 305, 537-539, 1983).

According to one approach to making bispecific antibodies, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are
25 fused to immunoglobulin constant region sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant region, comprising at least part of the hinge, CH2 and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy chain constant region (CH1), containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the
30 immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are cotransfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments

when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

In one approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. This asymmetric structure, with an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule, facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations. This approach is described in PCT Publication No. WO 94/04690.

In another approach, the bispecific antibodies are composed of amino acid modification in the first hinge region in one arm, and the substituted/replaced amino acid in the first hinge region has an opposite charge to the corresponding amino acid in the second hinge region in another arm. This approach is described in International Patent Application No. PCT/US2011/036419 (WO2011/143545).

In another approach, the bispecific antibodies can be generated using a glutamine-containing peptide tag engineered to the antibody directed to an epitope (e.g., Trop-2) in one arm and another peptide tag (e.g., a Lys-containing peptide tag or a reactive endogenous Lys) engineered to a second antibody directed to a second epitope in another arm in the presence of transglutaminase. This approach is described in International Patent Application No. PCT/IB2011/054899 (WO2012/059882).

Heteroconjugate antibodies, comprising two covalently joined antibodies, are also within the scope of the invention. Such antibodies have been used to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Pat. No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (PCT Publication Nos. WO 91/00360 and WO 92/200373; EP 03089). Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents and techniques are well known in the art, and are described in U.S. Pat. No. 4,676,980.

Chimeric or hybrid antibodies also may be prepared *in vitro* using known methods of synthetic protein chemistry, including those involving cross-linking agents. For

example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate.

In the recombinant humanized antibodies, the Fc γ portion can be modified to avoid interaction with Fc γ receptor and the complement and immune systems. The techniques for preparation of such antibodies are described in WO 99/58572. For example, the constant region may be engineered to more resemble human constant regions to avoid immune response if the antibody is used in clinical trials and treatments in humans. See, for example, U.S. Pat. Nos. 5,997,867 and 5,866,692.

The invention encompasses modifications to the antibodies and polypeptides of the invention variants shown in Table 1, including functionally equivalent antibodies which do not significantly affect their properties and variants which have enhanced or decreased activity and/or affinity. For example, the amino acid sequence may be mutated to obtain an antibody with the desired binding affinity to Trop-2. Modification of polypeptides is routine practice in the art and need not be described in detail herein. Examples of modified polypeptides include polypeptides with conservative substitutions of amino acid residues, one or more deletions or additions of amino acids which do not significantly deleteriously change the functional activity, or which mature (enhance) the affinity of the polypeptide for its ligand, or use of chemical analogs.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody fused to an epitope tag. Other insertional variants of the antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antibody of an enzyme or a polypeptide which increases the half-life of the antibody in the blood circulation.

Substitution variants have at least one amino acid residue in the antibody molecule removed and a different residue inserted in its place. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 3 under the heading of "conservative substitutions." If such substitutions result in a

change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 3, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

5 Table 3: Amino Acid Substitutions

Original Residue (naturally occurring amino acid)	Conservative Substitutions	Exemplary Substitutions
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the

molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring amino acid residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) Non-polar: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Polar without charge: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 5 (3) Acidic (negatively charged): Asp, Glu;
- (4) Basic (positively charged): Lys, Arg;
- (5) Residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and
- (6) Aromatic: Trp, Tyr, Phe, His.

10 Non-conservative substitutions are made by exchanging a member of one of these classes for another class.

Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the antibody also may be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule and prevent aberrant cross-linking. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the antibody to improve its stability, particularly where the antibody is an antibody fragment such as an Fv fragment.

15 Amino acid modifications can range from changing or modifying one or more amino acids to complete redesign of a region, such as the variable region. Changes in the variable region can alter binding affinity and/or specificity. In some embodiments, no more than one to five conservative amino acid substitutions are made within a CDR domain. In other embodiments, no more than one to three conservative amino acid substitutions are made within a CDR domain. In still other embodiments, the CDR domain is CDR H3 and/or CDR L3.

25 Modifications also include glycosylated and nonglycosylated polypeptides, as well as polypeptides with other post-translational modifications, such as, for example, glycosylation with different sugars, acetylation, and phosphorylation. Antibodies are glycosylated at conserved positions in their constant regions (Jefferis and Lund, Chem. Immunol. 65:111-128, 1997; Wright and Morrison, TibTECH 15:26-32, 1997). The oligosaccharide side chains of the immunoglobulins affect the protein's function (Boyd et al., Mol. Immunol. 32:1311-1318, 1996; Wittwe and Howard, Biochem. 29:4175-4180, 1990) and the intramolecular interaction between portions of the glycoprotein, which can affect the conformation and presented three-dimensional surface of the glycoprotein (Jefferis and Lund, supra; Wyss and Wagner, Current Opin. Biotech. 7:409-416, 1996).

30

Oligosaccharides may also serve to target a given glycoprotein to certain molecules based upon specific recognition structures. Glycosylation of antibodies has also been reported to affect antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). In particular, CHO cells with tetracycline-regulated expression of $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII), a glycosyltransferase catalyzing formation of bisecting GlcNAc, was reported to have improved ADCC activity (Umana et al., *Mature Biotech.* 17:176-180, 1999).

Glycosylation of antibodies is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine, asparagine-X-threonine, and asparagine-X-cysteine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-acetylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

Addition of glycosylation sites to the antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody (for O-linked glycosylation sites).

The glycosylation pattern of antibodies may also be altered without altering the underlying nucleotide sequence. Glycosylation largely depends on the host cell used to express the antibody. Since the cell type used for expression of recombinant glycoproteins, e.g. antibodies, as potential therapeutics is rarely the native cell, variations in the glycosylation pattern of the antibodies can be expected (see, e.g. Hse et al., *J. Biol. Chem.* 272:9062-9070, 1997).

In addition to the choice of host cells, factors that affect glycosylation during recombinant production of antibodies include growth mode, media formulation, culture density, oxygenation, pH, purification schemes and the like. Various methods have been proposed to alter the glycosylation pattern achieved in a particular host organism including introducing or overexpressing certain enzymes involved in oligosaccharide

production (U.S. Pat. Nos. 5,047,335; 5,510,261 and 5,278,299). Glycosylation, or certain types of glycosylation, can be enzymatically removed from the glycoprotein, for example, using endoglycosidase H (Endo H), N-glycosidase F, endoglycosidase F1, endoglycosidase F2, endoglycosidase F3. In addition, the recombinant host cell can be genetically engineered to be defective in processing certain types of polysaccharides. These and similar techniques are well known in the art.

Other methods of modification include using coupling techniques known in the art, including, but not limited to, enzymatic means, oxidative substitution and chelation. Modifications can be used, for example, for attachment of labels for immunoassay. Modified polypeptides are made using established procedures in the art and can be screened using standard assays known in the art, some of which are described below and in the Examples.

In some embodiments of the invention, the antibody comprises a modified constant region, such as a constant region that has increased affinity to a human Fc gamma receptor, is immunologically inert or partially inert, e.g., does not trigger complement mediated lysis, does not stimulate antibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC), or does not activate macrophages; or has reduced activities (compared to the unmodified antibody) in any one or more of the following: triggering complement mediated lysis, stimulating antibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC), or activating microglia. Different modifications of the constant region may be used to achieve optimal level and/or combination of effector functions. See, for example, Morgan et al., Immunology 86:319-324, 1995; Lund et al., J. Immunology 157:4963-9 157:4963-4969, 1996; Idusogie et al., J. Immunology 164:4178-4184, 2000; Tao et al., J. Immunology 143: 2595-2601, 1989; and Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76, 1998. In some embodiments, the constant region is modified as described in Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624; PCT Application No. PCT/GB99/01441; and/or UK Patent Application No. 9809951.8. In other embodiments, the antibody comprises a human heavy chain IgG2 constant region comprising the following mutations: A330P331 to S330S331 (amino acid numbering with reference to the wild type IgG2 sequence). Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624. In still other embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation. In some embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation by

mutating the glycosylated amino acid residue or flanking residues that are part of the N-glycosylation recognition sequence in the constant region. For example, N-glycosylation site N297 may be mutated to A, Q, K, or H. See, Tao et al., J. Immunology 143: 2595-2601, 1989; and Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76, 1998. In some
5 embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation. The constant region may be aglycosylated for N-linked glycosylation enzymatically (such as removing carbohydrate by enzyme PNGase), or by expression in a glycosylation deficient host cell.

Other antibody modifications include antibodies that have been modified as
10 described in PCT Publication No. WO 99/58572. These antibodies comprise, in addition to a binding domain directed at the target molecule, an effector domain having an amino acid sequence substantially homologous to all or part of a constant region of a human immunoglobulin heavy chain. These antibodies are capable of binding the target molecule without triggering significant complement dependent lysis, or cell-mediated
15 destruction of the target. In some embodiments, the effector domain is capable of specifically binding FcRn and/or FcγRIIb. These are typically based on chimeric domains derived from two or more human immunoglobulin heavy chain C_H2 domains. Antibodies modified in this manner are particularly suitable for use in chronic antibody therapy, to avoid inflammatory and other adverse reactions to conventional antibody
20 therapy.

The invention includes affinity matured embodiments. For example, affinity matured antibodies can be produced by procedures known in the art (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783, 1992; Barbas et al., Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813, 1994; Schier et al., Gene, 169:147-155, 1995; Yelton et al., J. Immunol.,
25 155:1994-2004, 1995; Jackson et al., J. Immunol., 154(7):3310-9, 1995; Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896, 1992; and PCT Publication No. WO2004/058184).

The following methods may be used for adjusting the affinity of an antibody and for characterizing a CDR. One way of characterizing a CDR of an antibody and/or altering (such as improving) the binding affinity of a polypeptide, such as an antibody,
30 termed "library scanning mutagenesis". Generally, library scanning mutagenesis works as follows. One or more amino acid positions in the CDR are replaced with two or more (such as 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20) amino acids

using art recognized methods. This generates small libraries of clones (in some embodiments, one for every amino acid position that is analyzed), each with a complexity of two or more members (if two or more amino acids are substituted at every position). Generally, the library also includes a clone comprising the native (unsubstituted) amino acid. A small number of clones, e.g., about 20-80 clones (depending on the complexity of the library), from each library are screened for binding affinity to the target polypeptide (or other binding target), and candidates with increased, the same, decreased, or no binding are identified. Methods for determining binding affinity are well-known in the art. Binding affinity may be determined using Biacore™ surface plasmon resonance analysis, which detects differences in binding affinity of about 2-fold or greater. Biacore™ is particularly useful when the starting antibody already binds with a relatively high affinity, for example a K_D of about 10 nM or lower. Screening using Biacore™ surface plasmon resonance is described in the Examples, herein.

Binding affinity may be determined using Kinexa Biocensor, scintillation proximity assays, ELISA, ORIGEN immunoassay (IGEN), fluorescence quenching, fluorescence transfer, and/or yeast display. Binding affinity may also be screened using a suitable bioassay.

In some embodiments, every amino acid position in a CDR is replaced (in some embodiments, one at a time) with all 20 natural amino acids using art recognized mutagenesis methods (some of which are described herein). This generates small libraries of clones (in some embodiments, one for every amino acid position that is analyzed), each with a complexity of 20 members (if all 20 amino acids are substituted at every position).

In some embodiments, the library to be screened comprises substitutions in two or more positions, which may be in the same CDR or in two or more CDRs. Thus, the library may comprise substitutions in two or more positions in one CDR. The library may comprise substitution in two or more positions in two or more CDRs. The library may comprise substitution in 3, 4, 5, or more positions, said positions found in two, three, four, five or six CDRs. The substitution may be prepared using low redundancy codons. See, e.g., Table 2 of Balint et al., Gene 137(1):109-18, 1993.

- 67 -

The CDR may be CDRH3 and/or CDRL3. The CDR may be one or more of CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, and/or CDRH3. The CDR may be a Kabat CDR, a Chothia CDR, or an extended CDR.

5 Candidates with improved binding may be sequenced, thereby identifying a CDR substitution mutant which results in improved affinity (also termed an "improved" substitution). Candidates that bind may also be sequenced, thereby identifying a CDR substitution which retains binding.

10 Multiple rounds of screening may be conducted. For example, candidates (each comprising an amino acid substitution at one or more position of one or more CDR) with improved binding are also useful for the design of a second library containing at least the original and substituted amino acid at each improved CDR position (i.e., amino acid position in the CDR at which a substitution mutant showed improved binding). Preparation, and screening or selection of this library is discussed further below.

15 Library scanning mutagenesis also provides a means for characterizing a CDR, in so far as the frequency of clones with improved binding, the same binding, decreased binding or no binding also provide information relating to the importance of each amino acid position for the stability of the antibody-antigen complex. For example, if a position of the CDR retains binding when changed to all 20 amino acids, that position is identified as a position that is unlikely to be required for antigen binding. Conversely, if
20 a position of CDR retains binding in only a small percentage of substitutions, that position is identified as a position that is important to CDR function. Thus, the library scanning mutagenesis methods generate information regarding positions in the CDRs that can be changed to many different amino acids (including all 20 amino acids), and positions in the CDRs which cannot be changed or which can only be changed to a few
25 amino acids.

Candidates with improved affinity may be combined in a second library, which includes the improved amino acid, the original amino acid at that position, and may further include additional substitutions at that position, depending on the complexity of the library that is desired, or permitted using the desired screening or selection method.
30 In addition, if desired, adjacent amino acid position can be randomized to at least two or more amino acids. Randomization of adjacent amino acids may permit additional conformational flexibility in the mutant CDR, which may in turn, permit or facilitate the

introduction of a larger number of improving mutations. The library may also comprise substitution at positions that did not show improved affinity in the first round of screening.

5 The second library is screened or selected for library members with improved and/or altered binding affinity using any method known in the art, including screening using Biacore™ surface plasmon resonance analysis, and selection using any method known in the art for selection, including phage display, yeast display, and ribosome display.

10 The invention also encompasses fusion proteins comprising one or more fragments or regions from the antibodies of this invention. In one embodiment, a fusion polypeptide is provided that comprises at least 10 contiguous amino acids of the variable light chain region shown in SEQ ID NOs: 1, 3, 6, 7, 8, 10, and 12 and/or at least 10 amino acids of the variable heavy chain region shown in SEQ ID NOs: 2, 4, 5, 9, 11, and 13. In other embodiments, a fusion polypeptide is provided that comprises at least about 10, at least about 15, at least about 20, at least about 25, or at least about 30 contiguous amino acids of the variable light chain region and/or at least about 10, at least about 15, at least about 20, at least about 25, or at least about 30 contiguous amino acids of the variable heavy chain region. In another embodiment, the fusion polypeptide comprises a light chain variable region and/or a heavy chain variable region, as shown in any of the sequence pairs selected from among SEQ ID NOs: 1 and 2, 3 and 4, 3 and 5, 6 and 5, 7 and 5, 8 and 9, 10 and 11, and 12 and 13. In another embodiment, the fusion polypeptide comprises one or more CDR(s). In still other embodiments, the fusion polypeptide comprises CDR H3 (VH CDR3) and/or CDR L3 (VL CDR3). For purposes of this invention, a fusion protein contains one or more antibodies and another amino acid sequence to which it is not attached in the native molecule, for example, a heterologous sequence or a homologous sequence from another region. Exemplary heterologous sequences include, but are not limited to a "tag" such as a FLAG tag or a 6His tag. Tags are well known in the art.

25

30 A fusion polypeptide can be created by methods known in the art, for example, synthetically or recombinantly. Typically, the fusion proteins of this invention are made by preparing an expressing a polynucleotide encoding them using recombinant methods

described herein, although they may also be prepared by other means known in the art, including, for example, chemical synthesis.

This invention also provides compositions comprising antibodies conjugated (for example, linked) to an agent that facilitate coupling to a solid support (such as biotin or avidin). For simplicity, reference will be made generally to antibodies with the understanding that these methods apply to any of the Trop-2 antibody embodiments described herein. Conjugation generally refers to linking these components as described herein. The linking (which is generally fixing these components in proximate association at least for administration) can be achieved in any number of ways. For example, a direct reaction between an agent and an antibody is possible when each possesses a substituent capable of reacting with the other. For example, a nucleophilic group, such as an amino or sulfhydryl group, on one may be capable of reacting with a carbonyl-containing group, such as an anhydride or an acid halide, or with an alkyl group containing a good leaving group (e.g., a halide) on the other.

The invention also provides isolated polynucleotides encoding the antibodies of the invention, and vectors and host cells comprising the polynucleotide.

Accordingly, the invention provides polynucleotides (or compositions, including pharmaceutical compositions), comprising polynucleotides encoding any of the following: the m7E6, h7E6, h7E6_SVG, h7E6_SVG1, h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6, h7E6_SVG7, h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11, h7E6_SVG12, h7E6_SVG13, h7E6_SVG14, h7E6_SVG15, h7E6_SVG16, h7E6_SVG17, h7E6_SVG18, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23, h7E6_SVG24, h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27, h7E6_SVG28, h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31, h7E6_SVG32, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h7E6_SVGN, m6G11, h6G11, h6G11_FKG_SF, or any fragment or part thereof having the ability to bind Trop-2.

In another aspect, the invention provides polynucleotides encoding any of the antibodies (including antibody fragments) and polypeptides described herein, such as antibodies and polypeptides having impaired effector function. Polynucleotides can be made and expressed by procedures known in the art.

In another aspect, the invention provides compositions (such as a pharmaceutical compositions) comprising any of the polynucleotides of the invention. In some embodiments, the composition comprises an expression vector comprising a polynucleotide encoding any of the antibodies described herein. In still other
5 embodiments, the composition comprises either or both of the polynucleotides shown in SEQ ID NO: 15 and SEQ ID NO: 14 below:

m7E6 heavy chain variable region

CAGGTCCAAC TGCAGGAATCAGGTCCAGGCCTGGTGAAACCGTCTGAAACCCTGA
GCCTGACATGCACCGTGAGCGGTGGTAGTATTAGCTCTTACGGCGTCCATTGGAT
10 CCGTCAACCGCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGATTGGCGTGATCTGGACCGGTGGT
AGCACCGACTATAACAGCGCACTGATGAGCCGCGTGACCATCTCGGTAGACACGT
CGAAAAACCA GTTCAGCCTGAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCGGATACCGCTGT
TTATTACTGCGCACGCGACGGGGATTATGATCGCTACACCATGGATTATTGGGGCC
AGGGTACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:15)

m7E6 light chain variable region

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGC
CACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGC
ACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATCTTGCATCC
AACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT
20 TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAG
CACAGTAGGGAGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
(SEQ ID NO:14)

In other embodiments, the composition comprises either or both of the polynucleotides shown in SEQ ID NO: 17 and SEQ ID NO: 16 below:

h7E6 heavy chain variable region

CAGGTCCAAC TGCAGGAATCAGGTCCAGGCCTGGTGAAACCGTCTGAAACCCTGA
GCCTGACATGCACCGTGAGCGGTGGTAGTATTAGCTCTTACGGCGTCCATTGGAT
CCGTCAACCGCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGATTGGCGTGATCTGGACCGGTGGT
AGCACCGACTATAACAGCGCACTGATGAGCCGCGTGACCATCTCGGTAGACACGT
30 CGAAAAACCA GTTCAGCCTGAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCGGATACCGCTGT
TTATTACTGCGCACGCGACGGGGATTATGATCGCTACACCATGGATTATTGGGGCC
AGGGTACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:17)

- 71 -

h7E6 light chain variable region

GATATCGTAATGACCCAATCTCCGGATTTCGCTGGCGGTATCACTGGGCGAACGTG
 CCACGATTAAGTCCCGTGCAAGCAAATCAGTGTGACCTCCGGCTACAGCTATATG
 CACTGGTATCAACAGAAACCGGGCCAGCCGCCGAAACTGCTGATCTATCTGGCTA
 5 GCAACCTGGAGAGCGGTGTGCCTGATCGCTTTAGTGGCTCCGGTAGCGGTACCGA
 TTTCACGCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCAGAAGACGTGGCCGTGTATTATTGTC
 AGCACAGCCGTGAGCTGCCGTATACTTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAAATCAA
 A (SEQ ID NO:16)

10 In still other embodiments, the composition comprises either or both of the
 polynucleotides shown in SEQ ID NO: 18 and SEQ ID NO: 16 below:

h7E6_SVG heavy chain variable region

CAGGTCCAAGTGCAGGAATCAGGTCCAGGCCTGGTGAACCGTCTGAAACCCTGA
 GCCTGACATGCACCGTGAGCGGTGGTAGTATTAGCTCTTACGCGTCCATTGGATCC
 GTCAACCGCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGATTGGCGTGATCTGGACCAGTGGTGT
 15 GACCGACTATAACAGCGCACTGATGGGCCGCGTGACCATCTCGGTAGACACGTCG
 AAAAACCAGTTCAGCCTGAAAGTGAAGCAGCGTGACCGCCGCGGATACCGCTGTTT
 ATTACTGCGCACGCGACGGGGATTATGATCGCTACACCATGGATTATTGGGGCCA
 GGGTACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:18)

h7E6_SVG light chain variable region

20 GATATCGTAATGACCCAATCTCCGGATTTCGCTGGCGGTATCACTGGGCGAACGTG
 CCACGATTAAGTCCCGTGCAAGCAAATCAGTGTGACCTCCGGCTACAGCTATATG
 CACTGGTATCAACAGAAACCGGGCCAGCCGCCGAAACTGCTGATCTATCTGGCTA
 GCAACCTGGAGAGCGGTGTGCCTGATCGCTTTAGTGGCTCCGGTAGCGGTACCGA
 TTTCACGCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCAGAAGACGTGGCCGTGTATTATTGTC
 25 AGCACAGCCGTGAGCTGCCGTATACTTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAAATCAA
 A (SEQ ID NO:16)

In other embodiments, the composition comprises either or both of the
 polynucleotides shown in SEQ ID NO: 18 and SEQ ID NO: 19 below:

h7E6_SVGL heavy chain variable region

30 CAGGTCCAAGTGCAGGAATCAGGTCCAGGCCTGGTGAACCGTCTGAAACCCTGA
 GCCTGACATGCACCGTGAGCGGTGGTAGTATTAGCTCTTACGCGTCCATTGGATCC
 GTCAACCGCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGATTGGCGTGATCTGGACCAGTGGTGT

- 72 -

GACCGACTATAACAGCGCACTGATGGGCCGCGTGACCATCTCGGTAGACACGTCG
AAAAACCAGTTCAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCGGATACCGCTGTTT
ATTACTGCGCACGCGACGGGGATTATGATCGCTACACCATGGATTATTGGGGCCA
GGGTACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:18)

5 *h7E6_SVGL light chain variable region*

GATATCGTAATGACCCAATCTCCGATTGCTGGCGGTATCACTGGGCGAACGTG
CCACGATTAAGTCCCGTGCAAGCAAATCAGTGTGACCTCCTTGTACAGCTATATG
CACTGGTATCAACAGAAACCGGGCCAGCCGCCGAAACTGCTGATCTATCTGGCTA
GCAACCTGGAGAGCGGTGTGCCTGATCGCTTTAGTGGCTCCGGTAGCGGTACCGA
10 TTTACGCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCAGAAGACGTGGCCGTGTATTATTGTC
AGCACAGCCGTGAGCTGCCGTATACTTTTGGCCAGGGGACAAAACCTGGAAATCAA
A (SEQ ID NO:19) (SEQ ID NO: 19).

In still other embodiments, the composition comprises either or both of the polynucleotides shown in SEQ ID NO: 18 and SEQ ID NO: 20 below:

15 *h7E6_SVGN heavy chain variable region*

CAGGTCCAAGTGCAGGAATCAGGTCCAGGCCTGGTGAAACCGTCTGAAACCCTGA
GCCTGACATGCACCGTGAGCGGTGGTAGTATTAGCTCTTACGCGTCCATTGGATCC
GTCAACCGCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGATTGGCGTGATCTGGACCAGTGGTGT
GACCGACTATAACAGCGCACTGATGGGCCGCGTGACCATCTCGGTAGACACGTCG
20 AAAAACCAGTTCAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCGGATACCGCTGTTT
ATTACTGCGCACGCGACGGGGATTATGATCGCTACACCATGGATTATTGGGGCCA
GGGTACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 18)

h7E6_SVGN light chain variable region

GATATCGTAATGACCCAATCTCCGATTGCTGGCGGTATCACTGGGCGAACGTG
25 CCACGATTAAGTCCCGTGCAAGCAAATCAGTGTGACCTCCAATTACAGCTATATG
CACTGGTATCAACAGAAACCGGGCCAGCCGCCGAAACTGCTGATCTATCTGGCTA
GCAACCTGGAGAGCGGTGTGCCTGATCGCTTTAGTGGCTCCGGTAGCGGTACCGA
TTTCACGCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCAGAAGACGTGGCCGTGTATTATTGTC
AGCACAGCCGTGAGCTGCCGTATACTTTTGGCCAGGGGACAAAACCTGGAAATCAA
30 A (SEQ ID NO: 20)

In other embodiments, the composition comprises either or both of the polynucleotides shown in SEQ ID NO: 25 and SEQ ID NO: 20 below:

- 73 -

h6G11_FKG_SF heavy chain variable region

CAGGTGCAGTTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTCAAGAAACCCGGCGCCTCCGTG
AAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTACACCTTCACCAGTTATTGGATTAAGTGGGT
GCGCCAGGCCCCAGGCCAGGGGCTGGAGTGGATGGGAAACATCTTCCCATCTGA
5 CTCTTACAGCAACTATAATAAGAAATTTAAGGATCGCGTAACAATGACCCGTGACAC
CAGCACCAGCACTGTTTACATGGAGCTGAGTTCTCTGCGTTCTGAAGATACCGCCG
TGTAATACTGCGCACGCGGTTCCGGGTTGATTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGT
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:25)

h6G11_FKG_SF light chain variable region

10 GAGATCGTGCTGACCCAAAGTCCAGCCACCCTTTCCCTGTCTCCAGGCGAACGCG
CAACCCTGAGCTGCCGCGCTTCTCAGACCATTGGTACCTCCATTCATTGGTATCAG
CAGAAGCCCGGCCAAGCCCCGCGTCTGCTGATCTATTACGCCTCAGAAAGTATTTT
AGGCATCCCCGCTCGCTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGAACCGACTTCACACTTACA
ATCTCTAGTTTGGAGCCAGAAGACTTCGCCGTTTACTACTGTTTCGCAGTCTTTTAGC
15 TGGCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACGAAGCTGGAAATCAAG (SEQ ID NO:26)

In other embodiments, the composition comprises either or both of the polynucleotides shown in SEQ ID NO: 22 and SEQ ID NO: 21 below:

m6G11 heavy chain variable region

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTG
20 AAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATAAACTGGGT
GAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATA
GTTATTCTAACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAAT
CCTCCAGCACAGCCTACATGCAGGTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGT
CTATTACTGTACGTACGGTAGTAGCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCA
25 CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:22)

m6G11 light chain variable region

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGT
CAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGACCATTGGCACAAGCATACTGGTATCAGC
AAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTG
30 GGATCCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATC
AACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGG
CCATTCACGTTTCGGCTCGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:21)

In other embodiments, the composition comprises either or both of the polynucleotides shown in SEQ ID NO: 24 and SEQ ID NO: 23 below:

h6G11 heavy chain variable region

CAGGTGCAGTTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTCAAGAAACCCGGCGCCTCCGTG
 5 AAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTACACCTTCACCAGTTATTGGATTAAGTGGGT
 GCGCCAGGCCCCAGGCCAGGGGCTGGAGTGGATGGGAAACATCTACCCATCTGA
 CTCTTACAGCAACTATAATCAGAAATTTAAGGATCGCGTAACAATGACCCGTGACAC
 CAGCACCAGCACTGTTTACATGGAGCTGAGTTCTCTGCGTTCTGAAGATACCGCCG
 TGTACTACTGCGCACGCGGTTCCAGTTTCGATTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGT
 10 CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 24)

h6G11 light chain variable region

GAGATCGTGCTGACCCAAAGTCCAGCCACCCTTTCCCTGTCTCCAGGCGAACGCG
 CAACCCTGAGCTGCCGCGCTTCTCAGACCATTGGTACCTCCATTTCATTGGTATCAG
 CAGAAGCCCGGCCAAGCCCCGCGTCTGCTGATCTATTACGCCTCAGAAAGTATTTTC
 15 AGGCATCCCCGCTCGCTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGAACCGACTTCACACTTACA
 ATCTCTAGTTTGGAGCCAGAAGACTTCGCCGTTTACTACTGTCAGCAGTCTAACAG
 CTGGCCATTTACCTTTGGCCAGGGCACGAAGCTGGAAATCAAG (SEQ ID NO: 23)

Expression vectors, and administration of polynucleotide compositions are further described herein.

20 In another aspect, the invention provides a method of making any of the polynucleotides described herein.

Polynucleotides complementary to any such sequences are also encompassed by the present invention. Polynucleotides may be single-stranded (coding or antisense) or double-stranded, and may be DNA (genomic, cDNA or synthetic) or RNA molecules.
 25 RNA molecules include HnRNA molecules, which contain introns and correspond to a DNA molecule in a one-to-one manner, and mRNA molecules, which do not contain introns. Additional coding or non-coding sequences may, but need not, be present within a polynucleotide of the present invention, and a polynucleotide may, but need not, be linked to other molecules and/or support materials.

30 Polynucleotides may comprise a native sequence (i.e., an endogenous sequence that encodes an antibody or a portion thereof) or may comprise a variant of such a sequence. Polynucleotide variants contain one or more substitutions, additions,

- 75 -

deletions and/or insertions such that the immunoreactivity of the encoded polypeptide is not diminished, relative to a native immunoreactive molecule. The effect on the immunoreactivity of the encoded polypeptide may generally be assessed as described herein. Variants preferably exhibit at least about 70% identity, more preferably, at least
5 about 80% identity, yet more preferably, at least about 90% identity, and most preferably, at least about 95% identity to a polynucleotide sequence that encodes a native antibody or a portion thereof.

Two polynucleotide or polypeptide sequences are said to be "identical" if the sequence of nucleotides or amino acids in the two sequences is the same when aligned
10 for maximum correspondence as described below. Comparisons between two sequences are typically performed by comparing the sequences over a comparison window to identify and compare local regions of sequence similarity. A "comparison window" as used herein, refers to a segment of at least about 20 contiguous positions, usually 30 to about 75, or 40 to about 50, in which a sequence may be compared to a
15 reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned.

Optimal alignment of sequences for comparison may be conducted using the Megalign program in the Lasergene suite of bioinformatics software (DNASTAR, Inc., Madison, WI), using default parameters. This program embodies several alignment
20 schemes described in the following references: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183,
25 Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman,
30 D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Preferably, the "percentage of sequence identity" is determined by comparing two optimally aligned sequences over a window of comparison of at least 20 positions,

- 76 -

wherein the portion of the polynucleotide or polypeptide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (i.e., gaps) of 20 percent or less, usually 5 to 15 percent, or 10 to 12 percent, as compared to the reference sequences (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences.

- 5 The percentage is calculated by determining the number of positions at which the identical nucleic acid bases or amino acid residue occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the reference sequence (i.e. the window size) and multiplying the results by 100 to yield the percentage of sequence identity.

- 10 Variants may also, or alternatively, be substantially homologous to a native gene, or a portion or complement thereof. Such polynucleotide variants are capable of hybridizing under moderately stringent conditions to a naturally occurring DNA sequence encoding a native antibody (or a complementary sequence).

- 15 Suitable "moderately stringent conditions" include prewashing in a solution of 5 X SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0); hybridizing at 50°C-65°C, 5 X SSC, overnight; followed by washing twice at 65°C for 20 minutes with each of 2X, 0.5X and 0.2X SSC containing 0.1 % SDS.

- As used herein, "highly stringent conditions" or "high stringency conditions" are those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example
20 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50 mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M
25 NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55°C, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C. The skilled artisan will
30 recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

- 77 -

It will be appreciated by those of ordinary skill in the art that, as a result of the degeneracy of the genetic code, there are many nucleotide sequences that encode a polypeptide as described herein. Some of these polynucleotides bear minimal homology to the nucleotide sequence of any native gene. Nonetheless, polynucleotides that vary due to differences in codon usage are specifically contemplated by the present invention. Further, alleles of the genes comprising the polynucleotide sequences provided herein are within the scope of the present invention. Alleles are endogenous genes that are altered as a result of one or more mutations, such as deletions, additions and/or substitutions of nucleotides. The resulting mRNA and protein may, but need not, have an altered structure or function. Alleles may be identified using standard techniques (such as hybridization, amplification and/or database sequence comparison).

The polynucleotides of this invention can be obtained using chemical synthesis, recombinant methods, or PCR. Methods of chemical polynucleotide synthesis are well known in the art and need not be described in detail herein. One of skill in the art can use the sequences provided herein and a commercial DNA synthesizer to produce a desired DNA sequence.

For preparing polynucleotides using recombinant methods, a polynucleotide comprising a desired sequence can be inserted into a suitable vector, and the vector in turn can be introduced into a suitable host cell for replication and amplification, as further discussed herein. Polynucleotides may be inserted into host cells by any means known in the art. Cells are transformed by introducing an exogenous polynucleotide by direct uptake, endocytosis, transfection, F-mating or electroporation. Once introduced, the exogenous polynucleotide can be maintained within the cell as a non-integrated vector (such as a plasmid) or integrated into the host cell genome. The polynucleotide so amplified can be isolated from the host cell by methods well known within the art. See, e.g., Sambrook et al., 1989.

Alternatively, PCR allows reproduction of DNA sequences. PCR technology is well known in the art and is described in U.S. Patent Nos. 4,683,195, 4,800,159, 4,754,065 and 4,683,202, as well as PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauswer Press, Boston, 1994.

RNA can be obtained by using the isolated DNA in an appropriate vector and inserting it into a suitable host cell. When the cell replicates and the DNA is transcribed

into RNA, the RNA can then be isolated using methods well known to those of skill in the art, as set forth in Sambrook et al., 1989, *supra*, for example.

Suitable cloning vectors may be constructed according to standard techniques, or may be selected from a large number of cloning vectors available in the art. While the cloning vector selected may vary according to the host cell intended to be used, useful cloning vectors will generally have the ability to self-replicate, may possess a single target for a particular restriction endonuclease, and/or may carry genes for a marker that can be used in selecting clones containing the vector. Suitable examples include plasmids and bacterial viruses, e.g., pUC18, pUC19, Bluescript (e.g., pBS SK+) and its derivatives, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, phage DNAs, and shuttle vectors such as pSA3 and pAT28. These and many other cloning vectors are available from commercial vendors such as BioRad, Strategene, and Invitrogen.

Expression vectors generally are replicable polynucleotide constructs that contain a polynucleotide according to the invention. It is implied that an expression vector must be replicable in the host cells either as episomes or as an integral part of the chromosomal DNA. Suitable expression vectors include but are not limited to plasmids, viral vectors, including adenoviruses, adeno-associated viruses, retroviruses, cosmids, and expression vector(s) disclosed in PCT Publication No. WO 87/04462. Vector components may generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence; an origin of replication; one or more marker genes; suitable transcriptional controlling elements (such as promoters, enhancers and terminator). For expression (i.e., translation), one or more translational controlling elements are also usually required, such as ribosome binding sites, translation initiation sites, and stop codons.

The vectors containing the polynucleotides of interest can be introduced into the host cell by any of a number of appropriate means, including electroporation, transfection employing calcium chloride, rubidium chloride, calcium phosphate, DEAE-dextran, or other substances; microprojectile bombardment; lipofection; and infection (e.g., where the vector is an infectious agent such as vaccinia virus). The choice of introducing vectors or polynucleotides will often depend on features of the host cell.

The invention also provides host cells comprising any of the polynucleotides described herein. Any host cells capable of over-expressing heterologous DNAs can be

- 79 -

used for the purpose of isolating the genes encoding the antibody, polypeptide or protein of interest. Non-limiting examples of mammalian host cells include but not limited to COS, HeLa, and CHO cells. See also PCT Publication No. WO 87/04462. Suitable non-mammalian host cells include prokaryotes (such as *E. coli* or *B. subtilis*) and yeast (such as *S. cerevisiae*, *S. pombe*; or *K. lactis*). Preferably, the host cells express the cDNAs at a level of about 5 fold higher, more preferably, 10 fold higher, even more preferably, 20 fold higher than that of the corresponding endogenous antibody or protein of interest, if present, in the host cells. Screening the host cells for a specific binding to Trop-2 or an Trop-2 domain (e.g., domains 1-4) is effected by an immunoassay or FACS. A cell overexpressing the antibody or protein of interest can be identified.

Trop-2 Antibody Conjugates

The present invention also provides a conjugate (or immunoconjugate) of the Trop-2 antibody as described herein, or of the antigen binding fragment thereof, wherein the antibody or the antigen binding fragment is conjugated to an agent (e.g., a cytotoxic agent) for targeted immunotherapy (e.g., antibody-drug conjugates) either directly or indirectly via a linker. For example, a cytotoxic agent can be linked or conjugated to the Trop-2 antibody or the antigen binding fragment thereof as described herein for targeted local delivery of the cytotoxic agent moiety to tumors (e.g., Trop-2 expressing tumor).

Methods for conjugating cytotoxic agent or other therapeutic agents to antibodies have been described in various publications. For example, chemical modification can be made in the antibodies either through lysine side chain amines or through cysteine sulfhydryl groups activated by reducing interchain disulfide bonds for the conjugation reaction to occur. See, e.g., Tanaka et al., FEBS Letters 579:2092-2096, 2005, and Gentle et al., Bioconjugate Chem. 15:658-663, 2004. Reactive cysteine residues engineered at specific sites of antibodies for specific drug conjugation with defined stoichiometry have also been described. See, e.g., Junutula et al., Nature Biotechnology, 26:925-932, 2008. Conjugation using an acyl donor glutamine-containing tag or an endogenous glutamine made reactive (i.e., the ability to form a covalent bond as an acyl donor) by polypeptide engineering in the presence of transglutaminase and an amine (e.g., a cytotoxic agent comprising or attached to a

reactive amine) is also described in International Patent Application Serial No. PCT/IB2011/054899 (WO2012/059882).

In some embodiments, the Trop-2 antibody or the conjugate as described herein comprises an acyl donor glutamine-containing tag engineered at a specific site of the antibody (e.g., a carboxyl terminus, an amino terminus, or at another site in the Trop-2 antibody). In some embodiments, the tag comprises an amino acid glutamine (Q) or an amino acid sequence GLLQGG (SEQ ID NO:78), LLQGA (SEQ ID NO:79), GLLQGA (SEQ ID NO:81), LLQ, LLQGPGK (SEQ ID NO: 90), LLQGPG (SEQ ID NO: 91), LLQGPA (SEQ ID NO: 92), LLQGP (SEQ ID NO: 93), LLQP (SEQ ID NO: 94), LLQPGK (SEQ ID NO: 95), LLQGAPGK (SEQ ID NO: 96), LLQGAPG (SEQ ID NO: 97), LLQGAP (SEQ ID NO: 98), LLQX₁X₂X₃X₄X₅, wherein X₁ is G or P, wherein X₂ is A, G, P, or absent, wherein X₃ is A, G, K, P, or absent, wherein X₄ is K, G or absent, and wherein X₅ is K or absent (SEQ ID NO: 88), or LLQX₁X₂X₃X₄X₅, wherein X₁ is any naturally occurring amino acid and wherein X₂, X₃, X₄, and X₅ are any naturally occurring amino acids or absent (SEQ ID NO: 89). In some embodiments, the Trop-2 antibody or the conjugate as described herein comprises an acyl donor glutamine-containing tag engineered at a specific site of the antibody, wherein the tag comprises an amino acid sequence GLLQGG (SEQ ID NO:78) engineered at the light chain carboxyl terminus of the Trop-2 antibody. In some embodiments, the Trop-2 antibody or the conjugate as described herein comprises an acyl donor glutamine-containing tag engineered at a specific site of the antibody, wherein the tag comprises an amino acid sequence GLLQGA (SEQ ID NO:81) engineered at the light chain carboxyl terminus of the Trop-2 antibody. In other embodiments, the Trop-2 antibody or the conjugate as described herein comprises an acyl donor glutamine-containing tag engineered at a specific site of the antibody, wherein the tag comprises an amino acid sequence LLQGA (SEQ ID NO:79) engineered at the heavy chain carboxyl terminus of the Trop-2 antibody and wherein the lysine residue at the heavy chain carboxyl terminus is deleted. In other embodiments, the Trop-2 antibody or the conjugate as described herein comprises an acyl donor glutamine-containing tag engineered at a specific site of the antibody, wherein the tag comprises an amino acid sequence LLQ engineered at the heavy chain carboxyl terminus of the Trop-2 antibody and wherein the lysine residue at the heavy chain carboxyl terminus is deleted. In some embodiments, the Trop-2 antibody or the

conjugate as described herein comprises an amino acid substitution from asparagine (N) to glutamine (Q) at position 297 of the Trop-2 antibody.

Also provided is an isolated antibody comprising an acyl donor glutamine-containing tag and an amino acid modification at position 222, 340, or 370 of the antibody (Kabat numbering scheme), wherein the modification is an amino acid deletion, insertion, substitution, mutation, or any combination thereof. Accordingly, in some embodiments, provided is the Trop-2 antibody or the conjugate as described herein comprising the acyl donor glutamine-containing tag (e.g., Q, GLLQGG (SEQ ID NO:78), LLQGA (SEQ ID NO:79), GLLQGA (SEQ ID NO:81), LLQ, LLQGPGK (SEQ ID NO: 90), LLQGPG (SEQ ID NO: 91), LLQGPA (SEQ ID NO: 92), LLQGP (SEQ ID NO: 93), LLQP (SEQ ID NO: 94), LLQPGK (SEQ ID NO: 95), LLQGAPGK (SEQ ID NO: 96), LLQGAPG (SEQ ID NO: 97), LLQGAP (SEQ ID NO: 98), LLQX₁X₂X₃X₄X₅, wherein X₁ is G or P, wherein X₂ is A, G, P, or absent, wherein X₃ is A, G, K, P, or absent, wherein X₄ is K, G or absent, and wherein X₅ is K or absent (SEQ ID NO: 88), or LLQX₁X₂X₃X₄X₅, wherein X₁ is any naturally occurring amino acid and wherein X₂, X₃, X₄, and X₅ are any naturally occurring amino acids or absent (SEQ ID NO: 89) conjugated at a specific site (e.g., at a carboxyl terminus of the heavy or light chain or at another site) of the Trop-2 antibody and an amino acid modification at position 222, 340, or 370 of the antibody (Kabat numbering scheme). In some embodiments, the amino acid modification is a substitution from lysine to arginine (e.g., K222R, K340R, or K370R). In some embodiments, the Trop-2 antibody or the conjugate as described herein comprises an acyl donor glutamine-containing tag comprising the sequence GLLQGG (SEQ ID NO:78) engineered at the C-terminus of the Trop-2 antibody light chain and an amino acid substitution from lysine to arginine at position 222 of the antibody (Kabat numbering scheme). In some embodiments, the Trop-2 antibody or the conjugate as described herein comprises an acyl donor glutamine-containing tag comprising the sequence GLLQGA (SEQ ID NO:81) engineered at the C-terminus of the Trop-2 antibody light chain and an amino acid substitution from lysine to arginine at position 222 of the antibody (Kabat numbering scheme). In some embodiments, the Trop-2 antibody or the conjugate as described herein comprises an acyl donor glutamine-containing tag comprising the sequence LLQGA (SEQ ID NO:79) engineered at the C-terminus of the Trop-2 antibody heavy chain and an amino acid substitution

from lysine to arginine at position 222 of the antibody (Kabat numbering scheme), wherein the lysine residue at the heavy chain carboxyl terminus is deleted. In some embodiments, the Trop-2 antibody or the conjugate as described herein comprises an acyl donor glutamine-containing tag comprising the sequence LLQ engineered at the C-terminus of the Trop-2 antibody heavy chain and an amino acid substitution from lysine to arginine at position 222 of the antibody (Kabat numbering scheme), wherein the lysine residue at the heavy chain carboxyl terminus is deleted. In some embodiments, the Trop-2 antibody or the conjugate as described herein comprises an acyl donor glutamine-containing tag comprising a glutamine engineered at position 297 of the Trop-2 antibody and an amino acid substitution from lysine to arginine at position 222 of the antibody (Kabat numbering scheme).

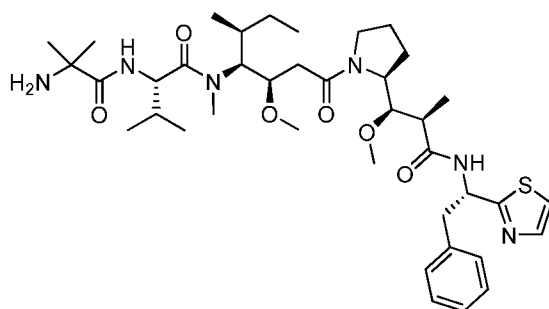
The agents that can be conjugated to the Trop-2 antibodies or the antigen binding fragments of the present invention include, but are not limited to, cytotoxic agents, immunomodulating agents, imaging agents, therapeutic proteins, biopolymers, or oligonucleotides.

Examples of a cytotoxic agent include, but are not limited to, an anthracycline, an auristatin, a dolastatin, CC-1065, a duocarmycin, an enediyne, a geldanamycin, a maytansine, a puromycin, a taxane, a vinca alkaloid, SN-38, tubulysin, hemiasterlin, and stereoisomers, isosteres, analogs or derivatives thereof.

The anthracyclines are derived from bacteria *Streptomyces* and have been used to treat a wide range of cancers, such as leukemias, lymphomas, breast, uterine, ovarian, and lung cancers. Exemplary anthracyclines include, but are not limited to, daunorubicin, doxorubicin (i.e., adriamycin), epirubicin, idarubicin, valrubicin, and mitoxantrone.

Dolastatins and their peptidic analogs and derivatives, auristatins, are highly potent antimitotic agents that have been shown to have anticancer and antifungal activity. See, e.g., U.S. Pat. No. 5,663,149 and Pettit et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965, 1998. Exemplary dolastatins and auristatins include, but are not limited to, dolastatin 10, auristatin E, auristatin EB (AEB), auristatin EFP (AEFP), MMAD (Monomethyl Auristatin D or monomethyl dolastatin 10), MMAF (Monomethyl Auristatin F or N-methylvaline-valine-dolaisoleuine-dolaproine-phenylalanine), MMAE (Monomethyl Auristatin E or N-methylvaline-valine-dolaisoleuine-dolaproine-

norephedrine), 5-benzoylvaleric acid-AE ester (AEVB), and other novel auristatins (such as the ones described in U.S. Application No. 61/561,255 and 61/676,423). In some embodiments, the auristatin is 0101 (2-methylalanyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-[(1*S*)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)ethyl]amino]propyl]pyrrolidin-1-yl]-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamide) having the following structure:



Duocarmycin and CC-1065 are DNA alkylating agents with cytotoxic potency. See Boger and Johnson, *PNAS* 92:3642-3649, 1995. Exemplary dolastatins and auristatins include, but are not limited to, (+)-docarmycin A and (+)-duocarmycin SA, and (+)-CC-1065.

Enediynes are a class of anti-tumor bacterial products characterized by either nine- and ten-membered rings or the presence of a cyclic system of conjugated triple-double-triple bonds. Exemplary enediynes include, but are not limited to, calicheamicin, esperamicin, and dynemicin.

Geldanamycins are benzoquinone ansamycin antibiotic that bind to Hsp90 (Heat Shock Protein 90) and have been used antitumor drugs. Exemplary geldanamycins include, but are not limited to, 17-AAG (17-N-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin) and 17-DMAG (17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin).

Maytansines or their derivatives maytansinoids inhibit cell proliferation by inhibiting the microtubules formation during mitosis through inhibition of polymerization of tubulin. See Remillard et al., *Science* 189:1002-1005, 1975. Exemplary maytansines and maytansinoids include, but are not limited to, mertansine (DM1) and its derivatives as well as ansamitocin.

Taxanes are diterpenes that act as anti-tubulin agents or mitotic inhibitors. Exemplary taxanes include, but are not limited to, paclitaxel (e.g., TAXOL[®]) and docetaxel (TAXOTERE[®]).

Vinca alkyls are also anti-tubulin agents. Exemplary vinca alkyls include, but are not limited to, vincristine, vinblastine, vindesine, and vinorelbine.

In some embodiments, the agent is an immunomodulating agent. Examples of an immunomodulating agent include, but are not limited to, gancyclovir, etanercept, 5 tacrolimus, sirolimus, voclosporin, cyclosporine, rapamycin, cyclophosphamide, azathioprine, mycophenolate mofetil, methotrexate, glucocorticoid and its analogs, cytokines, stem cell growth factors, lymphotoxins, tumor necrosis factor (TNF), hematopoietic factors, interleukins (e.g., interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, and IL-21), colony stimulating factors (e.g., granulocyte-colony stimulating factor 10 (G-CSF) and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)), interferons (e.g., interferons- α , - β and - γ), the stem cell growth factor designated "S 1 factor," erythropoietin and thrombopoietin, or a combination thereof.

In some embodiments, the agent is an imaging agent (e.g., a fluorophore or a PET (Positron Emission Tomography) label, SPECT (Single-Photon Emission 15 Computed Tomography) label), or MRI (Magnetic Resonance Imaging) label.

Examples of fluorophores include, but are not limited to, fluorescein isothiocyanate (FITC) (e.g., 5-FITC), fluorescein amidite (FAM) (e.g., 5-FAM), eosin, carboxyfluorescein, erythrosine, Alexa Fluor[®] (e.g., Alexa 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 647, 660, 680, 700, or 750), 20 carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) (e.g., 5-TAMRA), tetramethylrhodamine (TMR), and sulforhodamine (SR) (e.g., SR101).

In some embodiments, therapeutic or diagnostic radioisotopes or other labels (e.g., PET or SPECT labels) can be incorporated in the agent for conjugation to the Trop-2 antibodies or the antigen binding fragments as described herein. Examples of a 25 radioisotope or other labels include, but are not limited to, ³H, ¹¹C, ¹³N, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁵O, ³⁵S, ¹⁸F, ³²P, ³³P, ⁴⁷Sc, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷⁵Se, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ⁸⁶Y, ⁸⁹Zr, ⁹⁰Y, ⁹⁴Tc, ⁹⁵Ru, ⁹⁷Ru, ⁹⁹Tc, ¹⁰³Ru, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁵Ru, ¹⁰⁷Hg, ¹⁰⁹Pd, ¹¹¹Ag, ¹¹¹In, ¹¹³In, ¹²¹Te, ¹²²Te, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹²⁵Te, ¹²⁶I, ¹³¹I, ¹³¹In, ¹³³I, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁵³Pb, ¹⁵³Sm, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁵Tm, ¹⁶⁶Dy, ¹⁶⁶H, ¹⁶⁷Tm, ¹⁶⁸Tm, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁹Re, ¹⁹⁷Pt, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, 30 ²⁰¹Tl, ²⁰³Hg, ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹²Pb, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²²⁴Ac, and ²²⁵Ac.

In some embodiments, the agent is a therapeutic protein including, but is not limited to, a toxin, a hormone, an enzyme, and a growth factor.

Examples of a toxin protein (or polypeptide) include, but are not limited to, diphtheria (e.g., diphtheria A chain), *Pseudomonas* exotoxin and endotoxin, ricin (e.g., ricin A chain), abrin (e.g., abrin A chain), modeccin (e.g., modeccin A chain), alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, ribonuclease (RNase), DNase I, *Staphylococcal* enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, diphtherin toxin, *Phytolaca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, tricothecenes, inhibitor cystine knot (ICK) peptides (e.g., ceratotoxins), and conotoxin (e.g., KIIIA or SmIIIA).

In some embodiments, the agent is a biocompatible polymer. The Trop-2 antibodies or the antigen binding fragments as described herein can be conjugated to the biocompatible polymer to increase serum half-life and bioactivity, and/or to extend *in vivo* half-lives. Examples of biocompatible polymers include water-soluble polymer, such as polyethylene glycol (PEG) or its derivatives thereof and zwitterion-containing biocompatible polymers (e.g., a phosphorylcholine containing polymer).

In some embodiments, the agent is an oligonucleotide, such as anti-sense oligonucleotides.

In another aspect, the invention provides a conjugate of the antibody or the antigen binding fragment as described herein, wherein the conjugate comprises the formula: antibody-(acyl donor glutamine-containing tag)-(linker)-(cytotoxic agent), wherein the acyl donor glutamine-containing tag is engineered at a specific site of the antibody or the antigen binding fragment (e.g., at a carboxyl terminus of the heavy or light chain or at another site), wherein the tag is conjugated to a linker (e.g., a linker containing one or more reactive amines (e.g., primary amine NH_2)), and wherein the linker is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., MMAD or other auristatins such as 0101).

Examples of a linker containing one or more reactive amines include, but are not limited to, acetyl-lysine-valine-citrulline-*p*-aminobenzyloxycarbonyl (AcLys-VC-PABC) or amino PEG6-propionyl. See, e.g. WO2012/059882.

In some embodiments, the acyl donor glutamine-containing tag comprises GLLQGG (SEQ ID NO:78), LLQGA (SEQ ID NO:79), GLLQGA (SEQ ID NO:81), LLQ, LLQGPGK (SEQ ID NO: 90), LLQGPG (SEQ ID NO: 91), LLQGPA (SEQ ID NO: 92), LLQGP (SEQ ID NO: 93), LLQP (SEQ ID NO: 94), LLQPGK (SEQ ID NO: 95),

- 86 -

LLQGAPGK (SEQ ID NO: 96), LLQGAPG (SEQ ID NO: 97), LLQGAP (SEQ ID NO: 98), LLQX₁X₂X₃X₄X₅, wherein X₁ is G or P, wherein X₂ is A, G, P, or absent, wherein X₃ is A, G, K, P, or absent, wherein X₄ is K, G or absent, and wherein X₅ is K or absent (SEQ ID NO: 88), or LLQX₁X₂X₃X₄X₅, wherein X₁ is any naturally occurring amino acid and
 5 wherein X₂, X₃, X₄, and X₅ are any naturally occurring amino acids or absent (SEQ ID NO: 89).

In some embodiments, the conjugate is 1) antibody-LLQGA (SEQ ID NO: 79)-AcLys-VC-PABC-0101; 2) antibody-LLQGA (SEQ ID NO: 79)-AcLys-VC-PABC-MMAD; 3) antibody-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-AcLys-VC-PABC-0101; 4) antibody-
 10 LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-AcLys-VC-PABC-MMAD; 5) antibody-GGLLQGG (SEQ ID NO: 78)-AcLys-VC-PABC-0101; and 6) antibody-GGLLQGG (SEQ ID NO: 78)-AcLys-VC-PABC-MMAD. In some embodiments, the acyl donor glutamine-containing tag comprising, e.g., LLQ, SEQ ID NO: 79, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, or 98, is engineered at the C-terminus of the heavy chain of the antibody, wherein the lysine
 15 residue at the C-terminus is deleted. In other embodiments, the acyl donor glutamine-containing tag (e.g., GGLLQGG (SEQ ID NO: 78)) is engineered at the C-terminus of the light chain of the antibody. Examples of the antibody include, but are not limited to, h7E6_SVG, h7E6_SVG1, h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, and h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6, h7E6_SVG7, h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11,
 20 h7E6_SVG12, h7E6_SVG13, h7E6_SVG14, h7E6_SVG15, h7E6_SVG16, h7E6_SVG17, h7E6_SVG18, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23, h7E6_SVG24, h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27, h7E6_SVG28, h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31, h7E6_SVG32, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3,
 25 h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h7E6SVGN, h6G11, or h6G11_FKG_SF.

In one variation, the conjugate further comprises an amino acid substitution from lysine to arginine at position 222. Accordingly, for example, the conjugate is 1) antibody-GGLLQGG (SEQ ID NO: 78)-AcLys-VC-PABC-MMAD and comprises K222R; 2) antibody-GGLLQGG (SEQ ID NO: 78)-AcLys-VC-PABC-0101 and comprises K222R;
 30 3) antibody-LLQGA (SEQ ID NO: 79)-AcLys-VC-PABC-0101 and comprises K222R; 4) antibody-LLQGA (SEQ ID NO: 79)-AcLys-VC-PABC-MMAD and comprises K222R; and 5) antibody-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-AcLys-VC-PABC-MMAD and comprises

K222R. In some embodiments, the acyl donor glutamine-containing tag comprising, e.g., LLQ, SEQ ID NO: 79, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, or 98, is engineered at the C-terminus of the heavy chain of the antibody, wherein the lysine residue at the C-terminus is deleted. In other embodiments, the acyl donor glutamine-containing tag (e.g., GGLLQGG (SEQ ID NO: 78)) is engineered at the C-terminus of the light chain of the antibody. Examples of the antibody include, but are not limited to, h7E6_SVG, h7E6_SVG1, h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, and h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6, h7E6_SVG7, h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11, h7E6_SVG12, h7E6_SVG13, h7E6_SVG14, h7E6_SVG15, h7E6_SVG16, h7E6_SVG17, h7E6_SVG18, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23, h7E6_SVG24, h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27, h7E6_SVG28, h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31, h7E6_SVG32, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h6G11, or h6G11_FKG_SF.

In another aspect, the invention provides a conjugate of the antibody or the antigen binding fragment as described herein, the conjugate comprises amino acid substitutions at positions N297Q and K222R, a linker comprising amino-PEG6-propionyl, and a cytotoxic agent (e.g., MMAD or other auristatins). For example, the conjugate is h7E6_SVG, h7E6_SVG1, h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6, h7E6_SVG7, h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11, h7E6_SVG12, h7E6_SVG13, h7E6_SVG14, h7E6_SVG15, h7E6_SVG16, h7E6_SVG17, h7E6_SVG18, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23, h7E6_SVG24, h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27, h7E6_SVG28, h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31, h7E6_SVG32, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h6G11, or h6G11_FKG_SF conjugating to amino-PEG6-propionyl and MMAD or h7E6_SVG, h7E6_SVG1, h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6, h7E6_SVG7, h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11, h7E6_SVG12, h7E6_SVG13, h7E6_SVG14, h7E6_SVG15, h7E6_SVG16, h7E6_SVG17, h7E6_SVG18, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23, h7E6_SVG24, h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27, h7E6_SVG28,

h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31, h7E6_SVG32, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h6G11, or h6G11_FKG_SF conjugating to amino-PEG6-propionyl and 0101.

5 Methods of Using the Trop-2 Antibodies and the Antibody Conjugates Thereof

The antibodies and the antibody conjugates of the present invention are useful in various applications including, but are not limited to, therapeutic treatment methods and diagnostic treatment methods.

10 In one aspect, the invention provides a method for treating a condition associated with Trop-2 expression in a subject. In some embodiments, the method of treating a condition associated with Trop-2 expression in a subject comprises administering to the subject in need thereof an effective amount of a composition (e.g., pharmaceutical composition) comprising the Trop-2 antibodies or the Trop-2 antibody conjugates as described herein. The conditions associated with Trop-2 expression include, but are not
15 limited to, abnormal Trop-2 expression, altered or aberrant Trop-2 expression, Trop-2 overexpression, and a proliferative disorder (e.g., cancer).

Accordingly, in some embodiments, provided is a method of treating a cancer in a subject comprising administering to the subject in need thereof an effective amount of a composition comprising the Trop-2 antibodies or the Trop-2 antibody conjugates as
20 described herein. As used herein, cancers include, but are not limited to bladder, breast, cervical, choriocarcinoma, colon, esophageal, gastric, glioblastoma, head and neck, kidney, lung, oral, ovarian, pancreatic, prostate, and skin cancer. In some embodiments, provided is a method of inhibiting tumor growth or progression in a subject who has a Trop-2 expressing tumor, comprising administering to the subject in
25 need thereof an effective amount of a composition comprising the Trop-2 antibodies or the Trop-2 antibody conjugates as described herein. In other embodiments, provided is a method of inhibiting metastasis of Trop-2 expressing cancer cells in a subject, comprising administering to the subject in need thereof an effective amount of a composition comprising the Trop-2 antibodies or the Trop-2 antibody conjugates as
30 described herein. In other embodiments, provided is a method of inducing regression of a Trop-2 expressing tumor regression in a subject, comprising administering to the

subject in need thereof an effective amount of a composition comprising the Trop-2 antibodies or the Trop-2 antibody conjugates as described herein.

In another aspect, provided is a method of detecting, diagnosing, and/or monitoring a condition associated with Trop-2 expression. For example, the Trop-2
5 antibodies as described herein can be labeled with a detectable moiety such as an imaging agent and an enzyme-substrate label. The antibodies as described herein can also be used for *in vivo* diagnostic assays, such as *in vivo* imaging (e.g., PET or SPECT), or a staining reagent.

In some embodiments, the methods described herein further comprise a step of
10 treating a subject with an additional form of therapy. In some embodiments, the additional form of therapy is an additional anti-cancer therapy including, but not limited to, chemotherapy, radiation, surgery, hormone therapy, and/or additional immunotherapy.

In some embodiments, the additional form of therapy comprises administering
15 one or more therapeutic agent in addition to the Trop-2 antibodies or the Trop-2 antibody conjugates as described herein. The therapeutic agents include, but are not limited to, a second antibody (e.g., an anti-VEGF antibody, an anti-HER2 antibody, anti-CD25 antibody, and/or an anti-CD20 antibody), an angiogenesis inhibitor, a cytotoxic agent, an anti-inflammatory agent (e.g., paclitaxel, docetaxel, cisplatin, doxorubicin,
20 prednisone, mitomycin, progesterone, tamoxifen, or fluorouracil)

The Trop-2 antibody or the Trop-2 antibody conjugates can be administered to an individual via any suitable route. It should be understood by persons skilled in the art that the examples described herein are not intended to be limiting but to be illustrative of the techniques available. Accordingly, in some embodiments, the Trop-2 antibody or
25 the Trop-2 antibody conjugate is administered to an individual in accord with known methods, such as intravenous administration, e.g., as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, intracranial, transdermal, subcutaneous, intra-articular, sublingually, intrasynovial, via insufflation, intrathecal, oral, inhalation or topical routes. Administration can be systemic, e.g.,
30 intravenous administration, or localized. Commercially available nebulizers for liquid formulations, including jet nebulizers and ultrasonic nebulizers are useful for administration. Liquid formulations can be directly nebulized and lyophilized powder can

- 90 -

be nebulized after reconstitution. Alternatively, the Trop-2 antibody or the Trop-2 antibody conjugate can be aerosolized using a fluorocarbon formulation and a metered dose inhaler, or inhaled as a lyophilized and milled powder.

5 In one embodiment, the Trop-2 antibody or the Trop-2 antibody conjugate is administered via site-specific or targeted local delivery techniques. Examples of site-specific or targeted local delivery techniques include various implantable depot sources of the Trop antibody or the Trop-2 antibody conjugate or local delivery catheters, such as infusion catheters, indwelling catheters, or needle catheters, synthetic grafts, adventitial wraps, shunts and stents or other implantable devices, site specific carriers,
10 direct injection, or direct application. See, e.g., PCT Publication No. WO 00/53211 and U.S. Pat. No. 5,981,568.

Various formulations of the Trop-2 antibody or the Trop-2 antibody conjugate may be used for administration. In some embodiments, the Trop-2 antibody or the Trop-2 antibody conjugate may be administered neat. In some embodiments, of the Trop-2
15 antibody (or the Trop-2 antibody conjugate) and a pharmaceutically acceptable excipient may be in various formulations. Pharmaceutically acceptable excipients are known in the art, and are relatively inert substances that facilitate administration of a pharmacologically effective substance. For example, an excipient can give form or consistency, or act as a diluent. Suitable excipients include but are not limited to
20 stabilizing agents, wetting and emulsifying agents, salts for varying osmolarity, encapsulating agents, buffers, and skin penetration enhancers. Excipients as well as formulations for parenteral and nonparenteral drug delivery are set forth in Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000.

In some embodiments, these agents are formulated for administration by injection
25 (e.g., intraperitoneally, intravenously, subcutaneously, intramuscularly, etc.). Accordingly, these agents can be combined with pharmaceutically acceptable vehicles such as saline, Ringer's solution, dextrose solution, and the like. The particular dosage regimen, i.e., dose, timing and repetition, will depend on the particular individual and that individual's medical history.

30 Trop-2 antibodies or the Trop-2 antibody conjugates as described herein can be administered using any suitable method, including by injection (e.g., intraperitoneally, intravenously, subcutaneously, intramuscularly, etc.). The Trop-2 antibody or the Trop-2

- 91 -

antibody conjugate can also be administered via inhalation, as described herein. Generally, for administration of a Trop-2 antibody and a Trop-2 antibody conjugate, an initial candidate dosage can be about 2 mg/kg. For the purpose of the present invention, a typical daily dosage might range from about any of 3 µg/kg to 30 µg/kg to 5 300 µg/kg to 3 mg/kg, to 30 mg/kg, to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For example, dosage of about 1 mg/kg, about 2.5 mg/kg, about 5 mg/kg, about 10 mg/kg, and about 25 mg/kg may be used. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of symptoms occurs or until sufficient therapeutic 10 levels are achieved, for example, to inhibit or delay tumor growth/progression or metastasis of cancer cells. An exemplary dosing regimen comprises administering an initial dose of about 2 mg/kg, followed by a weekly maintenance dose of about 1 mg/kg of the Trop-2 antibody or Trop-2 antibody conjugate, or followed by a maintenance dose of about 1 mg/kg every other week. Other exemplary dosing regimen comprises 15 administering increasing doses (e.g., initial dose of 1 mg/kg and gradual increase to one or more higher doses every week or longer time period). Other dosage regimens may also be useful, depending on the pattern of pharmacokinetic decay that the practitioner wishes to achieve. For example, in some embodiments, dosing from one to four times a week is contemplated. In other embodiments dosing once a month or once every other 20 month or every three months is contemplated. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays. The dosing regimen (including the Trop-2 antibody or the Trop-2 antibody conjugate used) can vary over time.

For the purpose of the present invention, the appropriate dosage of a Trop-2 antibody or a Trop-2 antibody conjugate will depend on the Trop-2 antibody or the Trop-2 25 antibody conjugate (or compositions thereof) employed, the type and severity of symptoms to be treated, whether the agent is administered for therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the agent, the patient's clearance rate for the administered agent, and the discretion of the attending physician. Typically the clinician will administer a Trop-2 antibody or a Trop-2 antibody conjugate 30 until a dosage is reached that achieves the desired result. Dose and/or frequency can vary over course of treatment. Empirical considerations, such as the half-life, generally will contribute to the determination of the dosage. For example, antibodies that are

compatible with the human immune system, such as humanized antibodies or fully human antibodies, may be used to prolong half-life of the antibody and to prevent the antibody being attacked by the host's immune system. Frequency of administration may be determined and adjusted over the course of therapy, and is generally, but not necessarily, based on treatment and/or suppression and/or amelioration and/or delay of symptoms, e.g., tumor growth inhibition or delay, etc. Alternatively, sustained continuous release formulations of Trop-2 antibodies or Trop-2 antibody conjugates may be appropriate. Various formulations and devices for achieving sustained release are known in the art.

In one embodiment, dosages for a Trop-2 antibody or a trop-2 antibody conjugate may be determined empirically in individuals who have been given one or more administration(s) of the Trop-2 antibody or its Trop-2 antibody conjugate. Individuals are given incremental dosages of a Trop-2 antibody or a Trop-2 antagonist. To assess efficacy, an indicator of the disease can be followed.

Administration of an Trop-2 antibody or an Trop-2 antibody conjugate in accordance with the method in the present invention can be continuous or intermittent, depending, for example, upon the recipient's physiological condition, whether the purpose of the administration is therapeutic or prophylactic, and other factors known to skilled practitioners. The administration of a Trop-2 antibody or a Trop-2 antibody conjugate may be essentially continuous over a preselected period of time or may be in a series of spaced doses.

In some embodiments, more than one Trop-2 antibody or Trop-2 antibody conjugate may be present. At least one, at least two, at least three, at least four, at least five different or more Trop-2 antibody or Trop-2 antibody conjugate can be present.

Generally, those Trop-2 antibodies or Trop-2 antibody conjugates may have complementary activities that do not adversely affect each other. For example, one or more of the following Trop-2 antibody may be used: a first Trop-2 antibody directed to one epitope on Trop-2 and a second Trop-2 antibody directed to a different epitope on Trop-2.

Therapeutic formulations of the Trop-2 antibody or the Trop-2 antibody conjugate used in accordance with the present invention are prepared for storage by mixing an antibody having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable

carriers, excipients or stabilizers (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and may comprise buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; salts such as sodium chloride; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens, such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g. Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEENTM, PLURONICSTM or polyethylene glycol (PEG).

Liposomes containing the Trop-2 antibody or the Trop-2 antibody conjugate are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688, 1985; Hwang, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030, 1980; and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Pat. No. 5,013,556. Particularly useful liposomes can be generated by the reverse phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in

macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, e.g. films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or 'poly(vinylalcohol)'), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOTTM (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), sucrose acetate isobutyrate, and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by, for example, filtration through sterile filtration membranes. Therapeutic Trop-2 antibody or Trop-2 antibody conjugate compositions are generally placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

The compositions according to the present invention may be in unit dosage forms such as tablets, pills, capsules, powders, granules, solutions or suspensions, or suppositories, for oral, parenteral or rectal administration, or administration by inhalation or insufflation.

For preparing solid compositions such as tablets, the principal active ingredient is mixed with a pharmaceutical carrier, e.g. conventional tableting ingredients such as corn starch, lactose, sucrose, sorbitol, talc, stearic acid, magnesium stearate, dicalcium phosphate or gums, and other pharmaceutical diluents, e.g. water, to form a solid preformulation composition containing a homogeneous mixture of a compound of the present invention, or a non-toxic pharmaceutically acceptable salt thereof. When referring to these preformulation compositions as homogeneous, it is meant that the active ingredient is dispersed evenly throughout the composition so that the composition may be readily subdivided into equally effective unit dosage forms such as tablets, pills and capsules. This solid preformulation composition is then subdivided into unit dosage forms of the type described above containing from 0.1 to about 500 mg of the active

ingredient of the present invention. The tablets or pills of the novel composition can be coated or otherwise compounded to provide a dosage form affording the advantage of prolonged action. For example, the tablet or pill can comprise an inner dosage and an outer dosage component, the latter being in the form of an envelope over the former.

5 The two components can be separated by an enteric layer that serves to resist disintegration in the stomach and permits the inner component to pass intact into the duodenum or to be delayed in release. A variety of materials can be used for such enteric layers or coatings, such materials including a number of polymeric acids and mixtures of polymeric acids with such materials as shellac, cetyl alcohol and cellulose
10 acetate.

Suitable surface-active agents include, in particular, non-ionic agents, such as polyoxyethylenesorbitans (e.g. TweenTM 20, 40, 60, 80 or 85) and other sorbitans (e.g. SpanTM 20, 40, 60, 80 or 85). Compositions with a surface-active agent will conveniently comprise between 0.05 and 5% surface-active agent, and can be between
15 0.1 and 2.5%. It will be appreciated that other ingredients may be added, for example mannitol or other pharmaceutically acceptable vehicles, if necessary.

Suitable emulsions may be prepared using commercially available fat emulsions, such as IntralipidTM, LiposynTM, InfonutrolTM, LipofundinTM and LipiphysanTM. The active ingredient may be either dissolved in a pre-mixed emulsion composition or alternatively
20 it may be dissolved in an oil (e.g. soybean oil, safflower oil, cottonseed oil, sesame oil, corn oil or almond oil) and an emulsion formed upon mixing with a phospholipid (e.g. egg phospholipids, soybean phospholipids or soybean lecithin) and water. It will be appreciated that other ingredients may be added, for example glycerol or glucose, to adjust the tonicity of the emulsion. Suitable emulsions will typically contain up to 20%
25 oil, for example, between 5 and 20%. The fat emulsion can comprise fat droplets between 0.1 and 1.0 μm , particularly 0.1 and 0.5 μm , and have a pH in the range of 5.5 to 8.0.

The emulsion compositions can be those prepared by mixing a Trop-2 antibody or a Trop-2 antibody conjugate with IntralipidTM or the components thereof (soybean oil,
30 egg phospholipids, glycerol and water).

Compositions for inhalation or insufflation include solutions and suspensions in pharmaceutically acceptable, aqueous or organic solvents, or mixtures thereof, and

powders. The liquid or solid compositions may contain suitable pharmaceutically acceptable excipients as set out above. In some embodiments, the compositions are administered by the oral or nasal respiratory route for local or systemic effect. Compositions in preferably sterile pharmaceutically acceptable solvents may be
5 nebulised by use of gases. Nebulised solutions may be breathed directly from the nebulising device or the nebulising device may be attached to a face mask, tent or intermittent positive pressure breathing machine. Solution, suspension or powder compositions may be administered, preferably orally or nasally, from devices which deliver the formulation in an appropriate manner.

10

Compositions

The compositions used in the methods of the invention comprise an effective amount of a Trop-2 antibody or a Trop-2 antibody conjugate as described herein. Examples of such compositions, as well as how to formulate, are also described in an
15 earlier section and below. In some embodiments, the composition comprises one or more Trop-2 antibodies or Trop-2 antibody conjugates. For example, Trop-2 antibody recognizes human Trop-2. In some embodiments, the Trop-2 antibody is a human antibody, a humanized antibody, or a chimeric antibody. In some embodiments, the Trop-2 antibody comprises a constant region that is capable of triggering a desired
20 immune response, such as antibody-mediated lysis or ADCC. In other embodiments, the Trop-2 antibody comprises a constant region that does not trigger an unwanted or undesirable immune response, such as antibody-mediated lysis or ADCC. In other embodiments, the Trop-2 antibody comprises one or more CDR(s) of the antibody (such as one, two, three, four, five, or, in some embodiments, all six CDRs).

25 It is understood that the compositions can comprise more than one Trop-2 antibody or Trop-2 antibody conjugate (e.g., a mixture of Trop-2 antibodies that recognize different epitopes of Trop-2). Other exemplary compositions comprise more than one Trop-2 antibody or Trop-2 antibody conjugate that recognize the same epitope(s), or different species of Trop-2 antibodies or Trop-2 antibody conjugate that
30 bind to different epitopes of Trop-2 (e.g., human Trop-2).

The composition used in the present invention can further comprise pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers (Remington: The

- 97 -

Science and practice of Pharmacy 21st Ed., 2005, Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations, and may comprise buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g. Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN™, PLURONICS™ or polyethylene glycol (PEG). Pharmaceutically acceptable excipients are further described herein.

Kits

The invention also provides kits for use in the instant methods. Kits of the invention include one or more containers comprising the Trop-2 antibody or the Trop-2 antibody conjugate as described herein and instructions for use in accordance with any of the methods of the invention described herein. Generally, these instructions comprise a description of administration of the Trop-2 antibody or the Trop-2 antibody conjugate for the above described therapeutic treatments.

The instructions relating to the use of the Trop-2 antibodies or the Trop-2 antibody conjugates as described herein generally include information as to dosage, dosing schedule, and route of administration for the intended treatment. The containers may be unit doses, bulk packages (e.g., multi-dose packages) or sub-unit doses. Instructions supplied in the kits of the invention are typically written instructions on a label or package insert (e.g., a paper sheet included in the kit), but machine-readable

instructions (e.g., instructions carried on a magnetic or optical storage disk) are also acceptable.

The kits of this invention are in suitable packaging. Suitable packaging includes, but is not limited to, vials, bottles, jars, flexible packaging (e.g., sealed Mylar or plastic bags), and the like. Also contemplated are packages for use in combination with a specific device, such as an inhaler, nasal administration device (e.g., an atomizer) or an infusion device such as a minipump. A kit may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). The container may also have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is a Trop-2 antibody. The container may further comprise a second pharmaceutically active agent.

Kits may optionally provide additional components such as buffers and interpretive information. Normally, the kit comprises a container and a label or package insert(s) on or associated with the container.

Mutations and Modifications

To express the Trop-2 antibodies of the present invention, DNA fragments encoding VH and VL regions can first be obtained using any of the methods described above. Various modifications, e.g. mutations, substitutions, deletions, and/or additions can also be introduced into the DNA sequences using standard methods known to those of skill in the art. For example, mutagenesis can be carried out using standard methods, such as PCR-mediated mutagenesis, in which the mutated nucleotides are incorporated into the PCR primers such that the PCR product contains the desired mutations or site-directed mutagenesis.

One type of substitution, for example, that may be made is to change one or more cysteines in the antibody, which may be chemically reactive, to another residue, such as, without limitation, alanine or serine. For example, there can be a substitution of a non-canonical cysteine. The substitution can be made in a CDR or framework region of a variable domain or in the constant region of an antibody. In some embodiments, the cysteine is canonical.

The antibodies may also be modified, e.g. in the variable domains of the heavy and/or light chains, e.g., to alter a binding property of the antibody. For example, a mutation may be made in one or more of the CDR regions to increase or decrease the K_D of the antibody for Trop-2, to increase or decrease k_{off} , or to alter the binding specificity of the antibody. Techniques in site-directed mutagenesis are well-known in the art. See, e.g., Sambrook et al. and Ausubel et al., supra.

A modification or mutation may also be made in a framework region or constant region to increase the half-life of an Trop-2 antibody. See, e.g., PCT Publication No. WO 00/09560. A mutation in a framework region or constant region can also be made to alter the immunogenicity of the antibody, to provide a site for covalent or non-covalent binding to another molecule, or to alter such properties as complement fixation, FcR binding and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. According to the invention, a single antibody may have mutations in any one or more of the CDRs or framework regions of the variable domain or in the constant region.

In a process known as "germlining", certain amino acids in the V_H and V_L sequences can be mutated to match those found naturally in germline V_H and V_L sequences. In particular, the amino acid sequences of the framework regions in the V_H and V_L sequences can be mutated to match the germline sequences to reduce the risk of immunogenicity when the antibody is administered. Germline DNA sequences for human V_H and V_L genes are known in the art (see e.g., the "Vbase" human germline sequence database; see also Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson et al., J. Mol. Biol. 227:776-798, 1992; and Cox et al., Eur. J. Immunol. 24:827-836, 1994).

Another type of amino acid substitution that may be made is to remove potential proteolytic sites in the antibody. Such sites may occur in a CDR or framework region of a variable domain or in the constant region of an antibody. Substitution of cysteine residues and removal of proteolytic sites may decrease the risk of heterogeneity in the antibody product and thus increase its homogeneity. Another type of amino acid substitution is to eliminate asparagine-glycine pairs, which form potential deamidation sites, by altering one or both of the residues. In another example, the C-terminal lysine of the heavy chain of an Trop-2 antibody of the invention can be cleaved. In various

embodiments of the invention, the heavy and light chains of the Trop-2 antibodies may optionally include a signal sequence.

Once DNA fragments encoding the VH and VL segments of the present invention are obtained, these DNA fragments can be further manipulated by standard recombinant DNA techniques, for example to convert the variable region genes to full-length antibody chain genes, to Fab fragment genes, or to a scFv gene. In these manipulations, a VL- or VH-encoding DNA fragment is operatively linked to another DNA fragment encoding another protein, such as an antibody constant region or a flexible linker. The term "operatively linked", as used in this context, is intended to mean that the two DNA fragments are joined such that the amino acid sequences encoded by the two DNA fragments remain in-frame.

The isolated DNA encoding the VH region can be converted to a full-length heavy chain gene by operatively linking the VH-encoding DNA to another DNA molecule encoding heavy chain constant regions (CH1, CH2 and CH3). The sequences of human heavy chain constant region genes are known in the art (see e.g., Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The heavy chain constant region can be an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM or IgD constant region, but most preferably is an IgG1 or IgG2 constant region. The IgG constant region sequence can be any of the various alleles or allotypes known to occur among different individuals, such as Gm(1), Gm(2), Gm(3), and Gm(17). These allotypes represent naturally occurring amino acid substitution in the IgG1 constant regions. For a Fab fragment heavy chain gene, the V_H-encoding DNA can be operatively linked to another DNA molecule encoding only the heavy chain CH1 constant region. The CH1 heavy chain constant region may be derived from any of the heavy chain genes.

The isolated DNA encoding the VL region can be converted to a full-length light chain gene (as well as a Fab light chain gene) by operatively linking the VL-encoding DNA to another DNA molecule encoding the light chain constant region, CL. The sequences of human light chain constant region genes are known in the art (see e.g., Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition,

U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The light chain constant region can be a kappa or lambda constant region. The kappa constant region may be any of the various alleles known to occur
5 among different individuals, such as Inv(1), Inv(2), and Inv(3). The lambda constant region may be derived from any of the three lambda genes.

To create a scFv gene, the VH- and VL-encoding DNA fragments are operatively linked to another fragment encoding a flexible linker, e.g., encoding the amino acid sequence (Gly₄-Ser)₃, (SEQ ID NO: 80) such that the VH and VL sequences can be
10 expressed as a contiguous single-chain protein, with the VL and VH regions joined by the flexible linker (See e.g., Bird et al., 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554. The single chain antibody may be monovalent, if only a single VH and VL are used, bivalent, if two VH and VL are used, or polyvalent, if more than two VH and VL are
15 used. Bispecific or polyvalent antibodies may be generated that bind specifically to Trop-2 and to another molecule.

In another embodiment, a fusion antibody or immunoadhesin may be made that comprises all or a portion of an Trop-2 antibody of the invention linked to another polypeptide. In another embodiment, only the variable domains of the Trop-2 antibody
20 are linked to the polypeptide. In another embodiment, the VH domain of an Trop-2 antibody is linked to a first polypeptide, while the VL domain of an Trop-2 antibody is linked to a second polypeptide that associates with the first polypeptide in a manner such that the VH and VL domains can interact with one another to form an antigen binding site. In another preferred embodiment, the VH domain is separated from the VL
25 domain by a linker such that the VH and VL domains can interact with one another. The VH-linker- VL antibody is then linked to the polypeptide of interest. In addition, fusion antibodies can be created in which two (or more) single-chain antibodies are linked to one another. This is useful if one wants to create a divalent or polyvalent antibody on a single polypeptide chain, or if one wants to create a bispecific antibody.

30 In other embodiments, other modified antibodies may be prepared using Trop-2 antibody encoding nucleic acid molecules. For instance, "Kappa bodies" (Ill et al., Protein Eng. 10:949-57, 1997), "Minibodies" (Martin et al., EMBO J., 13:5303-9, 1994),

“Diabodies” (Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993), or “Janusins” (Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659, 1991 and Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52, 1992) may be prepared using standard molecular biological techniques following the teachings of the specification.

5 Bispecific antibodies or antigen binding fragments can be produced by a variety of methods including fusion of hybridomas or linking of Fab' fragments. See, e.g., Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, 1990, Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553, 1992. In addition, bispecific antibodies may be formed as “diabodies” or “Janusins.” In some embodiments, the bispecific antibody binds to two
10 different epitopes of Trop-2. In some embodiments, the modified antibodies described above are prepared using one or more of the variable domains or CDR regions from the Trop-2 antibodies provided herein.

Representative materials of the present invention were deposited in the American Type Culture Collection (ATCC) on April 26, 2012. Vector having ATCC Accession No.
15 PTA-12872 is a polynucleotide encoding a humanized Trop-2 antibody heavy chain variable region, and vector having ATCC Accession No. PTA-12871 is a polynucleotide encoding a humanized Trop-2 antibody light chain variable region. The deposits were made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and Regulations
20 thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the date of deposit. The deposit will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Pfizer, Inc. and ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the culture of the deposit to the public upon issuance of the pertinent U.S.
25 patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 U.S.C. Section 122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 C.F.R. Section 1.14 with particular reference to 886 OG 638).

30 The assignee of the present application has agreed that if a culture of the materials on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, the materials will be promptly replaced on notification with another of the

same. Availability of the deposited material is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

The following examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

10 Examples

Example 1: Antibody Binding Affinity Determination for Recombinant Anti-Trop-2 Mouse Antibodies

The affinities of anti-Trop-2 mouse antibodies generated from hybridomas were measured on a surface plasmon resonance Biacore™ 2000 or 3000 biosensor equipped with a research-grade CM5 sensor chip (Biacore™ AB, Uppsala, Sweden – now GE Healthcare). Anti-mouse IgG was first amine coupled to the CM5 sensor surface. Various anti-Trop-2 mouse IgGs were then captured by anti-mouse IgG. Monomeric Trop-2 extracellular domain prepared from papain digestion of Trop-2-Fc fusion protein was then injected as the analyte at 3 fold dilution series. Affinity of anti-Trop-2 mouse antibodies ranges from 7.5 to 31.8 nM. Table 4.

Table 4

Antibody	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(nM) to huTrop-2
3E9	1.83E+05	2.38E-03	13.0
6G11	2.70E+05	8.60E-03	31.8
7E6	1.60E+05	1.19E-03	7.5
15E2	1.61E+05	4.07E-03	25.3
18B1	4.37E+05	1.04E-02	23.8

Example 2: Domain Mapping of Recombinant Anti-Trop-2 Mouse Antibodies

Domain mapping was done by swapping the Trop-2 extracellular domains with either Trop-1 (EpCAM) or mouse Trop-2 equivalent regions. See Figures 4-5. Anti-Trop-2 antibodies 3E9, 6G11, 7E6, and 18B1 (expressed as recombinant mouse IgG2a) do not bind either human Trop-1 or mouse Trop-2 while 15E2 binds mouse Trop-2 but

not human Trop-1. These hybrid proteins were expressed as human Fc fusion proteins in 293F cells. Binding of anti-Trop-2 antibodies to these domain hybrids were determined by Biacore. Recognition of certain human Trop-2 domains by anti-Trop-2 antibodies were defined when domain swapping results in loss or reduction in binding.

- 5 Anti-Trop-2 antibody clones 3E9, 7E6, and 15E2 bind to domains 3 and 4 while clones 6G11 and 18B1 bind to domain 1. Table 5. Definition of different domains of Trop-2 can be found, e.g., in Chong et al., J. Biol. Chem. 276(8):5804-13, 2001.

Table 5

Binding of anti-Trop-2 antibodies to different Trop-2 domains					
	domain replacement	domain 1	domain 2	domain 3	domain 4
3E9	hTrop1	-	-	+	+
	mTrop-2	-	-	+/-	+
6G11	hTrop1	+	-	-	-
	mTrop-2	+	-	-	-
7E6	hTrop1	-	-	+	+
	mTrop-2	-	-	-	+
15E2	hTrop1	-	-	+	+/-
	mTrop-2	-	-	+/-	-
18B1	hTrop1	+	-	-	-
	mTrop-2	+	-	-	-

- 10 + indicates domain replacement results in loss of binding
 +/- indicates domain replacement results in decrease of binding
 - indicates domain replacement dose not affect binding

Example 3: *In Vivo* Efficacy Studies With Colo205 Xenograft Model

- 15 *In vivo* efficacy studies of Anti-Trop-2 mouse IgGs were performed with target-expressing colo205 xenograft model. One million colo205 colon cancer cells were implanted subcutaneously into 5-8 weeks old nu/nu mice (day 0). Animals were randomized by body weight the next day (day 1) into different treatment cohorts (control IgG, 7E6, 15E2, or 18B1 group; n=10/group). 20mg/kg of anti-Trop-2 antibodies from
- 20 different treatment cohorts and control mIgG were administered through bolus tail vein injection three times a week for total 12 doses. All experimental animals were monitored for body weight changes daily. Tumor volume was measured twice a week by a caliper device and calculated with the following formula: Tumor volume = (length x

width²) / 2. Studies were terminated before tumor volumes reached 2000 mm³. TGI (% tumor growth inhibition) was determined as [1-tumor sizes (treatment group)/tumor size (control group)] x 100. Table 6 and Figure 1 show that anti-Trop-2 antibodies 7E6, 15E2, and 18B1 inhibit Colo205 xenograft tumor growth *in vivo*.

5

Table 6

antibody treatment	Mean tumor volume (mm ³) on day 43	TGI (Tumor growth inhibition)
control IgG	673.0	0%
7E6	163.8	76%
15E2	582.0	14%
18B1	423.5	37%

Example 4: *In Vivo* Efficacy Studies With A431 Xenograft Model

a) Inhibition of A431 Xenograft Tumor Growth by Anti-Trop-2 antibodies 7E6, 15E2, and 18B1

10

In vivo efficacy studies of anti-Trop-2 mouse IgGs were performed with target-expressing A431 xenograft model. Two million A431 epidermoid cancer cells were implanted subcutaneously into 5-8 weeks old nu/nu mice until the tumor sizes reached around 100 mm³. Animals were randomized by tumor sizes and dosing was done through bolus tail vein injection. Anti-Trop-2 antibodies were expressed as recombinant mouse IgG2a antibodies from 293F transient expression. 20mg/kg of anti-Trop-2 antibodies (18B1, 15E2, and 7E6 recombinant mIgG2a) or control IgG were administered through bolus tail vein injection twice a week for total 6 doses. Tumor volume was measured twice a week by a caliper device and calculated with the following formula: Tumor volume = (length x width²) / 2. Studies were terminated before tumor volumes reached 2000 mm³. TGI (% tumor growth inhibition) was determined as [1-tumor sizes (treatment group)/tumor size (control group)] x 100. Table 7A and Figure 2A show that anti-Trop 2 antibodies 7E6, 15E2, and 18B1 inhibit A431 xenograft tumor growth *in vivo*.

25

Table 7A

antibody treatment	Mean tumor volume (mm ³) on day 27	TGI (Tumor growth inhibition)
control IgG	1814.8	0%
7E6	770.7	58%
15E2	953.6	47%
18B1	875.5	52%

b) *Inhibition of A431 Xenograft Tumor Growth by Anti-Trop-2 antibody 7E6 in Dose-Response Study*

5 Using the same xenograft model as described in Example 4a above, various doses of anti-Trop-2 7E6 antibody (5, 10, and 20 mg/kg) or 20 mg/kg control IgG were administered through bolus tail vein injection twice a week for total 6 doses. Table 7B and Figure 2B show inhibition of A431 xenograft tumor growth *in vivo* by various doses of 7E6.

10

Table 7B

antibody treatment	Mean tumor volume (mm ³) on day 27	TGI (Tumor growth inhibition)
control IgG	1814.8	0%
7E6-5mg/kg	913.9	50%
7E6-10mg/kg	897.7	51%
7E6-20mg/kg	875.5	52%

c) *Inhibition of A431 Xenograft Tumor Growth by Anti-Trop-2 antibodies 6G11, 7E6, and 18B1*

15 Similarly, 20 mg/kg of anti-Trop-2 antibodies (6G11, 7E6, and 18B1 and control IgG), all expressed recombinantly as mIgG2s, were administered through bolus tail vein injection once a week for a total of 3 doses in A431 xenograft model as described in

- 107 -

Example 4a). Table 7C and Figure 2C show that anti-Trop 2 antibodies 6G11, 7E6, and 18B1 inhibit A431 xenograft tumor growth *in vivo*.

Table 7C

antibody treatment	Mean tumor volume (mm ³) on day 27	TGI (Tumor growth inhibition)
control IgG	1044.0	0%
6G11	444.8	57%
7E6	561.0	46%
18B1	477.6	54%

5

Example 5: Antibody Binding Affinity Determination for Humanized Anti-Trop-2 Antibodies – 7E6

The affinities of chimeric and humanized anti-Trop-2 7E6 antibodies were measured on a surface plasmon resonance Biacore™ T200 biosensor equipped with a research-grade CM4 sensor chip (Biacore™ AB, Uppsala, Sweden – now GE Healthcare). The human Trop-2-hFc or cynomolgus monkey Trop-2-hFc proteins were captured on the CM5 EDA chip 37 sensor surface coupled with anti-human Fc. Chimeric and humanized 7E6 recombinant Fab fragments were injected as 3 fold dilution series. Tables 8A and 8B show affinity measurement of humanized anti-Trop-2 7E6 antibodies to human Trop-2 protein and cynomolgus monkey, respectively.

15

Table 8A

Antibody	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(nM) to huTrop-2
mouse7E6	1.66E+05	1.34E-03	8.08
h7E6-WT	1.39E+05	2.94E-03	21.10
h7E6_SVG	9.76E+04	4.35E-04	4.46
h7E6_L	1.30E+05	1.50E-04	1.15
h7E6_SVGL	1.31E+05	3.27E-05	0.25

20

Table 8B

Antibody	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_d(1/\text{s})$	KD(nM) to cynoTrop-2
mouse7E6	1.45E+05	2.40E-03	16.50
h7E6-WT	1.44E+05	6.35E-03	44.00
h7E6_SVG	2.65E+05	1.89E-03	7.00
h7E6_L	1.26E+05	3.35E-04	2.66
h7E6_SVGL	1.30E+05	7.42E-05	0.57

Example 6: Antibody Binding Affinity Determination for Humanized Anti-Trop-2 Antibodies – 6G11

- 5 The affinities of humanized 6G11 antibodies were measured on a surface plasmon resonance Biacore™ 2000 biosensor equipped with a research-grade CM5 sensor chip (Biacore™ AB, Uppsala, Sweden – now GE Healthcare). Human Trop-2-mFc protein was captured on the CM5 chip coupled with anti-mouse Fc. Human 6G11_WT or Human 6G11_FKG_SF chimeric Fab fragments were injected as 3 fold
- 10 dilution series. Table 9 shows affinity measurement of humanized anti-Trop-2 6G11 antibodies to human Trop-2 protein.

Table 9

Antibody	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_d(1/\text{s})$	KD(nM) to huTrop-2
h6G11_WT	3.60E+05	9.60E-03	27.0
h6G11_FKG_SF	6.40E+05	3.80E-04	0.6

- 15 Example 7: Flow Cytometry of Mouse and Humanized Anti-Trop-2 Antibodies on Trop-2 Positive and Negative Tumor Cells

a) 7E6

- Binding of mouse chimeric and humanized anti-Trop-2 7E6 antibodies (expressed in human IgG1 subtype) were assessed on Trop-2 expressing (A431 and
- 20 Colo205) and non-expressing (SW620) cells by flow cytometry. For A431 cell staining, 200,000 cells were incubated with 0.5 ug antibody in 100uL binding buffer (PBS (Phosphate Buffered Saline) + 0.5% BSA (Bovine Serum Albumin)), followed by incubation with Dylight488-conjugated goat anti-human (Fab')₂-specific secondary antibody from Jackson immunoresearch Laboratories (West Grove, PA). For Colo205

and SW620 cells, 300,000 cells were used with 1 ug of primary antibody, followed by AlexaFluor 647 anti-human (Fab')₂-specific secondary antibody from Jackson immunoresearch Laboratories (West Grove, PA). Table 10 shows at least about 93% binding on Trop-2 positive tumor cells by mouse 7E6 and humanized 7E6 antibodies.

5

Table 10

	A431 (Trop-2+++)		Colo205 (Trop-2 +)		SW620 (Trop-2 -)	
Antibody	MFI	% positive	MFI	% positive	MFI	% positive
2nd Ab only	1049	3.4	183	3.9	154	2.0
mouse 7E6	103000	94.0	2258	99.0	149	2.2
h7E6_WT	102000	94.8	1761	99.0	143	2.1
h7E6_SVG	121000	96.7	2425	100.0	139	2.4
h7E6_L	110000	95.1	2469	100.0	158	2.5
h7E6_N	149000	98.6	2698	100.0	151	2.3
h7E6_SVGL	107000	93.1	2425	100.0	135	2.6
h7E6_SVGN	128000	98.1	2734	100.0	140	2.5

b) 6G11

Similar to Example 7a), binding of chimeric mouse and humanized anti-Trop-2 6G11 antibodies (expressed in human IgG1 subtype) were assessed on Trop-2 expressing (A431 and Colo205) and non-expressing (SW620) cells by flow cytometry. 300,000 cells were used with 1 ug of primary antibody, followed by AlexaFluor 647 anti-human (Fab')₂-specific secondary antibody. Table 11 shows at least about 99% binding on Trop-2 positive tumor cells by mouse 6G11 and humanized 6G11 antibodies.

15

Table 11

	A431 (Trop-2+++)		Colo205 (Trop-2 +)		SW620 (Trop-2 -)	
Antibody	MFI	% positive	MFI	% positive	MFI	% positive
2nd Ab only	718	4.9	183	3.9	154	2.0
mouse 6G11	16204	99.9	1667	100.0	134	2.5
h6G11_WT	19573	99.9	1716	99.0	154	3.9
h6G11_FKG_SF	20254	99.9	2064	100.0	157	2.5

Example 8: ADCC Activity of Chimeric and Humanized Anti-Trop-2 7E6 hlgG1 Antibodies on A431 Cells

The ADCC (antibody-dependent cytotoxicity) activity of chimeric mouse (h7E6-WT) and humanized anti-Trop-2 7E6 human IgG1 antibodies (h7E6_SVG (VH region), h7E6_L (VL region), and h7E6-SVGL (both VH and VL regions)) were determined with the cytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega, Madison WI). Target expressing A431 cells were seeded at 10,000 cells/well the day before the assay. Donor PBMCs (Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells) were isolated through Ficoll gradient and cultured overnight at 37°C in X-VIVO medium (Lonza, Wakersville, MO). The antibodies were added to the wells the following day at concentrations indicated in Figure 3, followed by the addition of 500,000 PBMC cells (E:T=50:1) in RPMI+5% FBS (Fetal Bovine Serum). Anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) antibody (ERBITUX®, Imclone, Bridgewater, NJ) was used as a positive control for the assay. The plates were then incubated at 37°C for 4 hours. At 3 and half hours time point, 20 uL of the lysis solution was added to the target cells alone wells. After spinning the plate at 8000 rpm for 3 minutes, 50uL of supernatants were transferred to another plate. 50ul of substrate was then added to each well and the plate was incubated at room temperature for 30 minutes in the dark. The reaction was stopped by adding 50 uL of stop solution from Promega (Madison, WI) to each well. The plates were then read at 490 nm with a spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Percentages (%) of specific lysis were calculated with the following formula:

$$\% \text{ specific lysis} = \frac{(\text{treatment LDH (Lactate Dehydrogenase) release} - \text{target cell spontaneous LDH release} - \text{effector cell spontaneous LDH release})}{(\text{target cell maximum LDH release} - \text{target cell spontaneous LDH release})} \times 100$$

Figure 3 shows that both chimeric mouse and humanized anti-Trop-2 7E6 IgG1 antibodies induced ADCC killing in A431 cells.

Example 9: Cytotoxicity of Anti-Trop-2-ADCs in Trop-2 Positive Cells

Chimeric mouse (6G11 and 7E6) and humanized anti-Trop-2 (h7E6-SVG, h7E6-SVGL, and h7E6-SVGN) antibodies were expressed as human IgG1 subtypes engineered with glutamine-containing transglutaminase ("Q") tags (e.g., TG1, LCQ03, and TG6 correspond to SEQ ID NOs:75, (LLQGG); 78 (GGLLQGA), and 79 (LLQGA),

respectively) and conjugated with AcLys-vcMMAD (Acetyl-Lysine-Valine-Citrulline-MMAD), aminocaproyl-vc-PABC-MMAD (aminocaproyl-Valine-Citrulline-*p*-aminobenzyloxycarbonyl-MMAD), or AcLys-vc-PABC-MMAD (Acetyl-Lysine-Valine-Citrulline-*p*-aminobenzyloxycarbonyl-MMAD) as indicated in Table 12. In one instance, the transglutaminase tags can be engineered at the light chain or heavy chain C-terminus of the antibody; in other instance, the transglutaminase tag (e.g., Q) is engineered at another site of the antibody, such as at position 297 of the human IgG (Kabat numbering scheme). For example, the wild-type amino acid asparagine (N) is substituted with glutamine at position 297 of the Trop-2 antibody (N297Q). Anti-Trop-2 antibody conjugation to MMAD was then achieved via microbial transglutaminase-catalyzed transamidation reaction between the anti-Trop-2 antibody carrying a glutamine-containing tag at the specific site (e.g., carboxyl terminus or amino terminus of the heavy chain or light chain, position 297, or at another site of the antibody) and an amine-containing derivative of the payload (e.g., MMAD). In some instances, the wild-type amino acid lysine at the carboxyl terminus (position 447 in accordance with Kabat numbering scheme) was deleted and replaced with the Q-tag. In other instances, the wild-type amino acid lysine at position 222, 340, or 370 (in accordance with Kabat numbering scheme) was replaced with amino acid arginine ("K222R", "K340R", or "K370R"). For example, the K222R substitution was found to have the surprising effect of resulting in more homogenous antibody and payload conjugate, better intermolecular crosslinking between the antibody and the payload, and/or significant decrease in interchain crosslinking with the glutamine tag on the C terminus of the antibody light chain. In the transamidation reaction, the glutamine on the antibody acted as an acyl donor, and the amine-containing compound acted as an acyl acceptor (amine donor). Purified anti-Trop-2 antibody in the concentration of 1.67 – 4.04 μ M was incubated with a 20 – 100 M excess acyl acceptor, ranging between 167 – 404 μ M, in the presence of 0.225 – 0.545% (w/v) *Streptoverticillium mobaraense* transglutaminase (ACTIVA™, Ajinomoto, Japan) in 150 – 900 mM NaCl, and 25 mM MES, HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid] or Tris HCl buffer at pH range 6.2 – 8.8. The reaction conditions were adjusted for individual acyl acceptor derivatives, and the optimal efficiency and specificity were typically observed for 2.87 μ M antibody, 287 μ M derivative, and 0.378% (w/v) transglutaminase in 150 mM NaCl, 25 mM Tris HCl, pH

8.8. Following incubation at room temperature for 2.5 hours, the antibody was purified on MabSelect resin (GE Healthcare, Waukesha, WI) using standard affinity chromatography methods known to persons skilled in the art, such as commercial affinity chromatography from GE Healthcare.

- 5 Target expressing (A431, BxPC3, CAPAN-2 and Colo205) or non-expressing (SW620) cells were seeded on white walled clear bottom plates at 2000 cells/well for 24 hours before treatment. Cells were treated with 4 fold serially diluted antibody-drug conjugates in triplicates. Cell viability was determined by CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay 96 (Promega, Madison WI) 96 hours after treatment. Relative cell
- 10 viability was determined as percentage of untreated control. IC50 was calculated by Prism software. Table 12 shows that chimeric mouse and humanized anti-Trop-2 7E6 antibodies conjugated to MMAD through transglutaminase tag exert potent cell killing activity in Trop-2 expressing cells.

Table 12

			A431(Trop-2+++)		BxPC3(Trop-2++)		CAPAN-2(Trop-2+/++)		Colo205 (Trop-2+)		SW620 (Trop-2-)	
Name	conjugate	Loading	Ab-IC50 ug/mL	Ab-IC50 (nM)	Ab-IC50 ug/mL	Ab-IC50 (nM)	Ab-IC50 ug/mL	Ab-IC50 (nM)	Ab-IC50 (ug/mL)	Ab-IC50 (nM)	Ab-IC50 ug/mL	Ab-IC50 (nM)
6G11-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.86	0.030	0.197					0.379	2.525		
7E6-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.87	0.016	0.109	0.027	0.179	2.320	15.467	0.152	1.011	14.180	94.533
h7E6-WT-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.79	0.022	0.144	0.025	0.169	1.956	13.040	0.445	2.969	10.330	68.867
h7E6-L-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.85	0.020	0.132	0.035	0.232	2.027	13.513	0.082	0.549	8.535	56.900
h7E6-N-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.87	0.024	0.163			2.021	13.473	0.100	0.668	11.150	74.333

- 113 -

h7E6-SVG-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.88	0.016	0.105	0.031	0.206	1.659	11.060	0.118	0.787	10.680	71.200
h7E6-SVGL-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.85	0.018	0.120			2.440	16.267	0.052	0.345	10.800	72.000
h7E6-SVGN-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.87	0.023	0.153	0.051	0.337	2.009	13.393	0.083	0.552	10.410	69.400
NNC-TG1-vcMMA D	Aminocapryl-vcMMA D	1.83			7.260	48.400			22.790	151.933	22.990	153.267
7E6-TG1-vcMMA D	Aminocapryl-vcMMA D	1.87			0.030	0.197					24.180	161.200
h7E6-SVG-TG1-vcMMA D	Aminocapryl-vcMMA D	1.91			0.034	0.229					25.310	168.733
7E6-TG6-AcLys-vc-PABC-MMAD	AcLys-vc-PABC-MMAD	1.87			0.008	0.053						
7E6-K222R-LCQ3-AcLys-vc-PABC-MMAD	AcLys-vc-PABC-MMAD	0.74			0.008	0.054						
h7E6SVG-TG6-AcLys-vc-PABC-MMAD	AcLys-vc-PABC-MMAD	1.93	0.011	0.072	0.032	0.214			0.209	1.393		
h7E6SVG-K222R-LCQ3-AcLys-vc-PABC-MMAD	AcLys-vc-PABC-MMAD	1.90	0.011	0.07	0.014	0.092			2.681	17.873		

MMAD												
------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Example 10: Anti-Trop-2 7E6 Auristatin Conjugate Induced Long Term Tumor Regression in BxPC3 Xenograft Model

In vivo efficacy studies of control antibody hIgG1-TG1-vcMMAD (“NNCTG1-vcMMAD”) and chimeric anti-Trop-2 antibody 7E6 conjugated with 1) LCQ03-AcLys-vc-PABC-MMAD K222R variant or 2) TG6-AcLys-vc-PABC-MMAD via transglutaminase were performed with target-expressing BxPC3 xenograft model. For h7E6-K222R-LCQ03-AcLys-vc-PABC-MMAD variant conjugate, the wild-type amino acid lysine in the anti-Trop-2 antibody is substituted with amino acid arginine (i.e., K222R) at position 222 in accordance with Kabat numbering scheme. LCQ03 corresponds to SEQ ID NO:78 (GGLLQGG), and TG6 corresponds to SEQ ID NO:79 (LLQGA). General method of conjugating Trop-2 antibodies using transglutaminase tags LCQ03 and TG6 is described in Example 9. Two million BxPC3 cancer cells were implanted subcutaneously into 5-8 weeks old CB17 SCID mice until the tumor sizes reached around 250 mm³. Animals were randomized by tumor sizes, and dosing was done through bolus tail vein injection. 3 mg/kg of control hIgG1, chimeric h7E6-K222R-LCQ03-AcLys-vc-PABC-MMAD variant, or chimeric 7E6-TG6-AcLys-vc-PABC-MMAD were administered through bolus tail vein injection once for total of 1 dose. Tumor volume was measured once a week by a Caliper device and calculated with the following formula: Tumor volume = (length x width²) / 2. Studies were terminated before their tumor volumes reached 2000 mm³. Single dose of the chimeric anti-Trop-2 antibody 7E6 conjugated with AcLys-vc-PABC-MMAD resulted in long term tumor regression. See Figure 8.

Example 11: Cytotoxicity of Anti-Trop-2-ADCs in Trop-2 Positive Cells

Negative control (NNC) and humanized anti-Trop-2 (h7E6SVG) antibodies were expressed as human IgG1 subtypes engineered with glutamine-containing transglutaminase tags at the C-terminus of heavy chain (TG6 (SEQ ID NO: 79)), light chain (LCQ03 (SEQ ID NO: 78) and LCQ04 (SEQ ID NO: 79)) or with N297Q/K222R mutations in the CH2/Hinge domains of heavy chain and conjugated with AcLys-vc-PABC-0101 (“vc0101” or Acetyl-lysine-valine-citrulline-*p*-aminobenzyloxycarbonyl-(2-

methyalanyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-
 {[(1*S*)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl]-5-methyl-1-
 oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamide)) or aminocaproyl-PEG6 (Propylene Glycol)₆-
 propionyl)-MMAD as indicated. 2-methyalanyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-[(2*S*)-2-
 5 [(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-[(1*S*)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-
 yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl]-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamide
 is a novel auristatin, as described in U.S. Application Nos: 61/561,255 and 61/676,423.
 Method of conjugating Trop-2 antibodies using transglutaminase tags is described in
 Example 9. Target expressing or non-expressing (SW620) cells were seeded on white
 10 walled clear bottom plates at 2000 (A431, BxPC3, NCI-H292, NCI-H1650, MDA-MB-468
 and SW620), 2500 (Calu-3) or 3000 (OVCAR3 and SKBR3) cells per well for 24 hours
 before treatment. Cells were treated with 4 fold serially diluted antibody-drug
 conjugates in triplicates. Cell viability was determined by CellTiter-Glo[®] Luminescent
 Cell Viability Assay 96 (Promega, Madison, WI) 96 hours after treatment. Relative cell
 15 viability was determined as percentage of untreated control. IC₅₀ was calculated by
 GraphPad Prism 5 software and expressed as concentration (nM) of total Ab. Table 13
 shows that humanized anti-Trop-2 7E6 antibodies conjugated to vc0101 or PEG6-
 MMAD through transglutaminase tag exert potent cell killing activity in Trop-2
 expressing cells.

20

Table 13

Cell name	Cell type	Trop2 expression	h7E6SVG-TG6-vc0101 Ab IC50 (nM)	h7E6SVG-G-N297Q/K222R-PEG6MMAD Ab IC50 (nM)	h7E6SVG-LCQ03/K222R-vc0101 Ab IC50 (nM)	h7E6SVG-LCQ04/K222R-vc0101 Ab IC50 (nM)	NNC-TG6-vc0101 Ab IC50 (nM)	NNC-N297Q/K222R-PEG6MMAD Ab IC50 (nM)
A431	Epidermoid carcinoma	+++	0.12	0.07	0.03			>267
BxPC3	Pancreas adenocarcinoma	++	0.32	0.03	0.13	0.11		
NCI-H292	Mucoepidermoid pulmonary carcinoma	++	0.63	0.03		1.84		

Calu-3	Lung adenocarcinoma	++	0.53	0.50		1.51		
NCI-H1650	Lung bronchoalveolar carcinoma	++	1.92	0.38			>267	>267
OVCAR3	Ovary adenocarcinoma	+++	0.56	0.98			168.5	>267
MDA-MB-468	Mammary adenocarcinoma	++	0.77	0.19			>267	>267
SKBR3	Mammary adenocarcinoma	+ / ++	0.42	0.08			200.5	>267
Colo205	Colorectal adenocarcinoma	+	32.89	21.15	174.50			
SW620	Colorectal adenocarcinoma	-	156.20	>267	>267	>267	>267	>267

Example 12: Anti-Trop-2 7E6 Auristatin Conjugate Induced Tumor Regression in Pancreatic Tumor BxPC3 Xenograft Model

In vivo efficacy studies of Trop-2 ADCs were performed with target-expressing BxPC3 xenograft model. Two million BxPC3 pancreatic cancer cells were implanted subcutaneously into 5-8 weeks old CB17/SCID mice until the tumor sizes reached between 300-400 mm³. Animals were randomized by tumor sizes, and single dose of humanized anti-Trop2 antibody conjugated with 1) TG6-AcLys-vc-PABC-0101 (equivalent to TG6-AcLys-vc-0101 as depicted in Figure 9A); 2) N297Q/K222R-PEG6-MMAD ((Propylene Glycol)₆-propionyl-MMAD); and 3) LCQ04-K222R-vc-PABC0101 (equivalent to LCQ04/K222R-vc0101 as depicted in Figure 9C); LCQ04 corresponds to SEQ ID NO: 79 (LLQGA)) and control conjugates were administered through bolus tail vein injection. Tumor volume was measured once a week by a Caliper device and calculated with the following formula: Tumor volume = (length x width²) / 2. Studies were terminated before their tumor volumes reached 2000 mm³. Figures 9A-9C show that a single dose of the humanized anti-Trop2 antibody conjugated with 1) TG6-AcLys-vc-PABC-0101; 2) N297Q/K222R-PEG6-MMAD; and 3) LCQ04-K222R-vc-PABC0101 resulted in tumor regression in pancreatic tumor BxPC3 xenograft model.

Example 13: Anti-Trop-2 7E6 Auristatin Conjugate Induced Tumor Regression in Colorectal Tumor Colo205 Xenograft Model

In vivo efficacy study of Trop-2 ADCs was performed with target-expressing colo205 xenograft model. Three millions of colo205 colon cancer cells were implanted subcutaneously into 5-8 weeks old nu/nu mice until the tumor sizes reached ~300 mm³. Animals were randomized by tumor sizes, and single dose of 6mg/kg humanized anti-Trop2 antibody conjugated with 1) TG6-AcLys-vc-PABC-0101 (equivalent to TG6-vc-0101 as depicted in Figure 10); and 2) LCQ03-vc-PABC-0101 having K222R substitution in the hinge/CH2 domains of heavy chain (equivalent to LCQ03/K222R-vc0101 as depicted in Figure10; LCQ03 corresponds to SEQ ID NO: 78 (GGLLQGG)); and control conjugate (IgG-vc-PABC-0101) were administered through bolus tail vein injection. Tumor volume is measured once a week by a Caliper device and calculated with the following formula: Tumor volume = (length x width²) / 2. Studies were terminated before their tumor volumes reached 2000 mm³. Figure 10 shows that a single dose of the humanized anti-Trop2 antibody conjugated with 1) TG6-AcLys-vc-PABC-0101; and 2) LCQ03-vc-PABC-0101 having K222R substitution in the hinge/CH2 domains of heavy chain resulted in tumor regression in colorectal tumor Colo205 xenograft model.

Example 14: Anti-Trop-2 7E6 Auristatin Conjugate Induced Tumor Regression in Ovarian PDX Ova196756 Xenograft Model

In vivo efficacy study of Trop-2 ADC using humanized anti-Trop2 antibody (h7E6SVG) conjugated with TG6-vc-0101 was performed with target-expressing ovarian cancer patient derived xenograft model (PDX Ova196756). This tumor sample was derived from surgical specimen and propagated in NSG mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine). For efficacy studies, approximately 1-2 mm³ of tumor fragments were implanted subcutaneously into the lateral flanks of CB17/SCID mice. Animals were randomized by tumor sizes once they reached ~400 mm³, and a single dose of h7E6SVG-TG6-AcLys-vc-PABC-0101 (0.75 mg/kg and 1.5 mg/kg; equivalent to TG6-vc0101 as depicted in Figure 11) and control conjugate (1.5 mg/kg; IgG-vc-PABC-0101 or IgG-vc0101 as depicted in Figure 11) were administered through bolus tail vein injection. Tumor volume was measured once a week by a caliper device and calculated

with the following formula: Tumor volume = (length x width²) / 2. Studies were terminated before their tumor volumes reached 2000 mm³. Figures 11 shows that a single dose of the humanized anti-Trop2 antibody conjugated with TG6-AcLys-vc-PABC-0101 resulted in tumor regression in ovarian PDX Ova196756 xenograft model.

5

Example 15: Anti-Trop-2 7E6 Auristatin Conjugate Shows Superior Efficacy Than Gemcitabine to Induce Tumor Regression in Pan0146 Pancreatic PDX Model

In vivo efficacy studies of Trop-2 ADC using humanized anti-Trop-2 antibody (h7E6SVG) conjugated with TG6-vc0101 were performed with target-expressing pancreatic cancer patient derived xenograft model (PDX Pan0146) from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). For efficacy studies, 1-2 mm³ of tumor fragments were implanted subcutaneously into the lateral flanks of the animals. Animals were randomized by tumor sizes once they reached ~300 mm³, and h7E6SVG-TG6-AcLys-vc-PABC-0101 and the control conjugate were administered through bolus tail vein injection. Figure 12A: Single dose of h7E6SVG-TG6-AcLys-vc-PABC-0101 (shown as h7E6SVG-TG6-vc0101 in the Figure) and control conjugate were given at doses indicated. Gemcitabine was given at 75 mg/kg twice weekly for a total of 6 doses. Figure 12B: h7E6SVG-TG6-AcLys-vc-PABC-0101 was given at 0.75 mg/kg weekly for 4 doses, 1.5 mg/kg bi-weekly for two doses or 3.0 mg/kg single dose. Gemcitabine was given once weekly at 75 mg/kg for 4 doses. Tumor volume was measured once a week by a Caliper device and calculated with the following formula: Tumor volume = (length x width²) / 2. Studies were terminated before their tumor volumes reached 2000 mm³. The data show that the humanized anti-Trop2 antibody conjugated with TG6-AcLys-vc-PABC-0101 has superior efficacy to gemcitabine to induce tumor regression in Pan0146 pancreatic PDX model and that continuous dosing of h7E6SVG-TG6-AcLys-vc-PABC-0101 resulted in sustained tumor regression in pancreatic PDX Pan0146 xenograft model.

Example 16: Anti-Trop-2 7E6 Auristatin Conjugate Induces Tumor Regression in Pancreatic Pan144607 PDX Model

In vivo efficacy study of Trop-2 ADC using humanized anti-Trop-2 antibody (h7E6SVG) conjugated with vc0101 or PEG6MMAD was performed with target-

- 119 -

expressing pancreatic cancer patient derived xenograft model (PDX Pan144607). This tumor sample was derived from surgical specimen and propagated in NSG mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine). For efficacy studies, approximately 1-2 mm³ of tumor fragments were implanted subcutaneously into the lateral flanks of
5 CB17/SCID mice. Animals were randomized by tumor sizes once they reached ~300 mm³, and single dose of 1.5, 3.0 and 6.0 mg/kg h7E6SVG-N297Q/K222R-PEG6MMAD and the control conjugate were administered through bolus tail vein injection. Tumor volume was measured once a week by a Caliper device and calculated with the following formula: Tumor volume = (length x width²) / 2. Studies were terminated
10 before their tumor volumes reach 2000 mm³. Figure 13 shows that a single dose of the humanized anti-Trop2 antibody conjugated with PEG6-MMAD resulted in tumor regression in pancreatic Pan144607 PDX model.

Example 17: Anti-Trop-2 7E6 Auristatin Conjugate Induces Tumor Regression in
15 Pancreatic Pan0135 PDX Model

In vivo efficacy study of Trop-2 ADC using humanized anti-Trop-2 antibody (h7E6SVG) conjugated with PEG6MMAD was performed with target-expressing pancreatic cancer patient derived xenograft model (PDX Pan0135) from Jackson Laboratories. For efficacy studies, approximately 1-2 mm³ of tumor fragments were
20 implanted subcutaneously into the lateral flanks of the animals. Animals were randomized by tumor sizes once they reached ~300 mm³ and 6mg/kg of h7E6SVG-N297Q/K222R-PEG6MMAD and the control conjugate were administered through bolus tail vein injection with single dose. Tumor volume was measured once a week by a Caliper device and calculated with the following formula: Tumor volume = (length x
25 width²) / 2. Studies were terminated before their tumor volumes reached 2000 mm³. Figure 14 shows that a single dose of the humanized anti-Trop2 antibody conjugated with PEG6-MMAD resulted in tumor regression in pancreatic Pan0135 PDX model.

Example 18: Antibody Binding Affinity Determination for Humanized Anti-Trop-2
30 Antibodies

Analysis of Fab/human Trop2-ECD (Extracellular Domain) interactions was performed using a Bio-Rad Proteon XPR36 Surface Plasmon Resonance (SPR)

biosensor (Bio-Rad, Hercules, CA) equipped with a GLC sensor chip. The assay temperature was 25°C, and the assay buffer was 10 mM Sodium Phosphate, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.4. An array of amine-coupled Fabs was prepared using the methodology described in Abdiche et al. (Anal. Biochem., 411: 139-151 (2011)). In each analysis cycle, monovalent human Trop2-ECD antigen was flowed at 30 μ L/min over the immobilized Fabs for 3 minutes followed by a buffer wash for 15 minutes to monitor dissociation of the Fab/Trop2 complex. The sensor surface was regenerated between analysis cycles, using three 18-second injections of a 2:1 mixture (by volume) of Pierce IgG Elution buffer:4 M NaCl (Pierce, Rockford, IL). Binding and regeneration cycles were repeated at human Trop2-ECD concentrations of 6, 30 and 150 nM. The resulting data were fit to a 1:1 Langmuir binding model using the Proteon evaluation software. The results appear in the table below.

Table 14

Sequence	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	K_D (nM)
DG (h7E6_SVG)	1.7E+05	6.9E-04	17	4.1
DK (h7E6_SVG20)	< 1.7E+05	1.3E-02	0.88	> 75
DA (h7E6_SVG22)	< 1.8E+05	1.3E-02	0.86	> 75
DL (h7E6_SVG28)	< 2.1E+05	1.6E-02	0.72	> 75
DE (h7E6_SVG30)	< 8.5E+05	6.4E-02	0.18	> 75
DS (h7E6_SVG19)	< 6.0E+05	4.5E-02	0.26	> 75

Although the disclosed teachings have been described with reference to various applications, methods, kits, and compositions, it will be appreciated that various changes and modifications can be made without departing from the teachings herein and the claimed invention below. The foregoing examples are provided to better illustrate the disclosed teachings and are not intended to limit the scope of the teachings presented herein. While the present teachings have been described in terms of these exemplary embodiments, the skilled artisan will readily understand that numerous variations and modifications of these exemplary embodiments are possible without

undue experimentation. All such variations and modifications are within the scope of the current teachings.

5 All references cited herein, including patents, patent applications, papers, text books, and the like, and the references cited therein, to the extent that they are not already, are hereby incorporated by reference in their entirety. In the event that one or more of the incorporated literature and similar materials differs from or contradicts this application, including but not limited to defined terms, term usage, described techniques, or the like, this application controls.

10 The foregoing description and Examples detail certain specific embodiments of the invention and describes the best mode contemplated by the inventors. It will be appreciated, however, that no matter how detailed the foregoing may appear in text, the invention may be practiced in many ways and the invention should be construed in accordance with the appended claims and any equivalents thereof.

- 122 -

Claims

It is claimed:

1. An isolated antibody, or an antigen binding fragment thereof, which
5 specifically binds to trophoblast cell-surface antigen-2 (Trop-2), wherein the antibody comprises
- (a) a heavy chain variable (VH) region complementary determining regions comprising (i) a VH complementary determining region one (CDR1) comprising the sequence SYGVH (SEQ ID NO: 30), GGSISSY (SEQ ID NO: 36), or
10 GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37); (ii) a VH CDR2 comprising the sequence VIWTX₁GX₂TDYNSALMX₃, wherein X₁ is G or S; X₂ is S or V; X₃ is S or G (SEQ ID NO: 49), or WTX₁GX₂, wherein X₁ is G or S, X₂ is S or V (SEQ ID NO: 50); and (iii) a VH CDR3 comprising the sequence DYDRYTX₁DY, wherein X₁ is E or M (SEQ ID NO: 82); and/or
- 15 (b) a light chain variable region (VL) region complementary determining regions comprising (i) a VL CDR1 comprising the sequence RASKSVSTSX₁YSYMH, wherein X₁ is G, L, or N (SEQ ID NO: 63); (ii) a VL CDR2 comprising the sequence LASNLES (SEQ ID NO: 55); and (iii) a VL CDR3 comprising the sequence QHSRELPYT (SEQ ID NO: 56);
- 20 2. An isolated antibody, or an antigen binding fragment thereof, which specifically binds to Trop-2, wherein the antibody comprises:
- a VH region comprising a VH CDR1, VH CDR2, and VH CDR3 of the VH sequence shown in SEQ ID NO: 5 or 85; and/or
- a VL region comprising VL CDR1, VL CDR2, and VL CDR3 of the VL sequence
25 shown in SEQ ID NO:3 or 6.
3. The antibody or the antigen binding fragment of claim 2, wherein the VH region comprises (i) a VH CDR1 comprising the sequence SYGVH (SEQ ID NO: 30), GGSISSY (SEQ ID NO: 36), or GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37); (ii) a VH CDR2 comprising the sequence VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38) or WTSGV (SEQ

ID NO: 39); and (iii) a VH CDR3 comprising the sequence DGDYDRYTMDY (SEQ ID NO: 35), DYDRYTMDY (SEQ ID NO: 99), or DYDRYTEDY (SEQ ID NO: 100).

4. The antibody or antigen binding fragment of claim 3, wherein the VL region comprises (i) a VL CDR1 comprising the sequence RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO: 54) or RASKSVSTSLYSYMH (SEQ ID NO: 57) ; (ii) a VL CDR2 comprising the sequence LASNLES (SEQ ID NO: 55); and (iii) a VL CDR3 comprising the sequence QHSRELPYT (SEQ ID NO: 56).

5. The antibody or the antigen binding fragment of claim 4, wherein the VH region comprises the sequence shown in SEQ ID NO: 5, 85 or a variant with one or several conservative amino acid substitutions in residues that are not within a CDR and/or the VL region comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 3, 6 or a variant thereof with one or several amino acid substitutions in amino acids that are not within a CDR.

6. The antibody or the antigen binding fragment of claim 5, wherein the antibody comprises a light chain comprising the sequence shown in SEQ ID NO: 66 and a heavy chain comprising the sequence shown in SEQ ID NO: 65 or 102 .

7. The antibody or the antigen binding fragment of claim 3, wherein the antibody comprises a VH region produced by the expression vector with ATCC Accession No. PTA-12872.

8. The antibody or the antigen binding fragment of claim 4, wherein the antibody comprises a VL region produced by the expression vector with ATCC Accession No. PTA-12871.

9. An isolated antibody, or an antigen binding fragment thereof, which specifically binds to domain 3 and domain 4 of human Trop-2 (SEQ ID NO:27) with a monovalent antibody binding affinity (K_D) of about 6.5 nM or less as measured by surface plasmon resonance.

10. An isolated antibody, or an antigen binding fragment thereof, which specifically binds to Trop-2, wherein the antibody comprises

- 124 -

(a) a heavy chain variable (VH) region complementary determining regions comprising (i) a VH complementary determining region one (CDR1) comprising the sequence SYWIN (SEQ ID NO: 40), GYTFTSY (SEQ ID NO: 41), or GYTFTSYWIN (SEQ ID NO: 42); (ii) a VH CDR2 comprising the sequence NIX₁PSDSYSN₁YX₂KFKD wherein X₁ is Y or F; X₂ is Q or K, or X₁PSDSY wherein X₁ is Y or F (SEQ ID NO: 52); and (iii) a VH CDR3 comprising the sequence GSX₁FDY wherein X₁ is S or G (SEQ ID NO: 53); and/or

(b) a light chain variable region (VL) region complementary determining regions comprising (i) a VL CDR1 comprising the sequence RASQTIGTSH (SEQ ID NO: 59); (ii) a VL CDR2 comprising the sequence YASESIS (SEQ ID NO: 60); and (iii) a VL CDR3 comprising the sequence X₁QX₂SWPFT wherein X₁ is Q or S; X₂ is N or F (SEQ ID NO: 64).

11. An isolated antibody, or an antigen binding fragment thereof, which specifically binds to Trop-2, wherein the antibody comprises:

a VH region comprising a VH CDR1, VH CDR2, and VH CDR3 of the VH sequence shown in SEQ ID NO: 13; and/or

a VL region comprising VL CDR1, VL CDR2, and VL CDR3 of the VL sequence shown in SEQ ID NO: 12.

12. The antibody or the antigen binding fragment of claim 11, wherein the VH region comprises (i) a VH CDR1 comprising the sequence SYWIN (SEQ ID NO: 40), GYTFTSY (SEQ ID NO: 41), or GYTFTSYWIN (SEQ ID NO: 42); (ii) a VH CDR2 comprising the sequence NIFPSDSYSN₁YKFKD (SEQ ID NO: 46) or FPSDSY (SEQ ID NO: 47); and (iii) a VH CDR3 comprising the sequence GSGFDY (SEQ ID NO: 48).

13. The antibody or antigen binding fragment of claim 12, wherein the VL region comprises (i) a VL CDR1 comprising the sequence RASQTIGTSH (SEQ ID NO: 59); (ii) a VL CDR2 comprising the sequence YASESIS (SEQ ID NO: 60); and (iii) a VL CDR3 comprising the sequence SQSFSWPFT (SEQ ID NO: 62).

14. The antibody or the antigen binding fragment of claim 13, wherein the VH region comprises the sequence shown in SEQ ID NO: 13 or a variant with one or several conservative amino acid substitutions in residues that are not within a CDR and/or the VL region comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 12 or a variant thereof with one or several amino acid substitutions in amino acids that are not within a CDR.

15. The antibody or the antigen binding fragment of claim 14, wherein the antibody comprises a light chain comprising the sequence shown in SEQ ID NO: 68 and a heavy chain comprising the sequence shown in SEQ ID NO: 67.

16. An isolated antibody which specifically binds to Trop-2 and competes with the antibody of claim 2 or 4.

17. The antibody of claim 16, wherein the antibody has a monovalent antibody binding affinity (K_D) of about 6.5 nM or less as measured by surface plasmon resonance.

18. The antibody of any one of claims 1-15, wherein the antibody comprises an acyl donor glutamine-containing tag engineered at a specific site.

19. The antibody of claim 18, wherein the tag comprises an amino acid sequence GGLLQGG (SEQ ID NO: 78), LLQGA (SEQ ID NO: 79), or LLQ.

20. The antibody of claim 19, wherein the antibody further comprises an amino acid modification at position 222, 340, or 370.

21. The antibody of claim 20, wherein the amino acid modification is a substitution from lysine to arginine.

22. A conjugate of the antibody or the antigen binding fragment of any one of claims 1-15 and 18-21, wherein the antibody or the antigen binding fragment is conjugated to an agent, wherein the agent is selected from the group consisting of a cytotoxic agent, an immunomodulating agent, an imaging agent, a therapeutic protein, a biopolymer, and an oligonucleotide.

23. The conjugate of claim 22, wherein the agent is a cytotoxic agent.

24. The conjugate of claim 23, wherein the cytotoxic agent is MMAD (Monomethyl Auristatin D) or 0101 (2-methylalanyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-[(1*S*)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl]-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamide).

25. The conjugate of claim 24, wherein the conjugate comprises the formula: antibody-(acyl donor glutamine-containing tag)-(linker)-(cytotoxic agent).

26. The conjugate of claim 25, wherein the acyl donor glutamine-containing tag comprises an amino acid sequence GLLQGG (SEQ ID NO: 78), LLQGA (SEQ NO: 79), LLQ, or LLQX₁X₂X₃X₄X₅, wherein X₁ is G or P, wherein X₂ is A, G, P, or absent, wherein X₃ is A, G, K, P, or absent, wherein X₄ is G, K, or absent, and wherein X₅ is K or absent (SEQ ID NO: 88), and wherein the linker comprises acetyl-lysine-valine-citrulline-*p*-aminobenzyloxycarbonyl or amino-PEG6-propionyl.

27. The conjugate of claim 26, wherein the conjugate is selected from the group consisting of 1) antibody-LLQGA (SEQ ID NO: 79)- (acetyl-lysine-valine-citrulline-*p*-aminobenzyloxycarbonyl (AcLys-VC-PABC))-0101; 2) antibody-LLQGA (SEQ ID NO: 79)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD; 3) antibody-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-(AcLys-VC-PABC)-0101; 4) antibody-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD; 5) antibody -GLLQGG (SEQ ID NO: 78)- (AcLys-VC-PABC)-0101; and 6) antibody-GLLQGG (SEQ ID NO: 78)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD.

28. The conjugate of claim 27, wherein the conjugate 1) antibody -GLLQGG (SEQ ID NO: 78)-(AcLys-VC-PABC)-0101; 2) antibody-GLLQGG (SEQ ID NO: 78)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD; 3) antibody-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-(AcLys-VC-PABC)-0101; 4) antibody-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD; 5) antibody-LLQGA (SEQ ID NO: 79)-(AcLys-VC-PABC)-0101; or 6) antibody-LLQGA (SEQ ID NO: 79)- AcLys-VC-PABC-MMAD comprises an amino acid substitution from lysine to arginine at position 222.

29. The conjugate of claim 27, wherein the conjugate 1) antibody-LLQGA (SEQ ID NO: 79)-(AcLys-VC-PABC)-0101; 2) antibody-LLQGA (SEQ ID NO: 79)-

AcLys-VC-PABC-MMAD; 3) antibody-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-(AcLys-VC-PABC)-0101; or 4) antibody-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD, wherein the amino acid lysine at the C-terminus of heavy chain of the antibody is deleted.

5 30. The conjugate of claim 24, wherein the conjugate comprises amino acid substitutions at position N297Q and K222R, a linker comprising amino-PEG6-propionyl, and a cytotoxic agent comprising MMAD.

 31. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of the antibody of any one of claims 1-15 or the conjugate of any one of claims
10 22-30 and a pharmaceutically acceptable carrier.

 32. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding the antibody of any one of claims 1-15.

 33. A vector comprising the polynucleotide of claim 32.

 34. An isolated host cell that recombinantly produces the antibody of any one
15 of claims 1-15.

 35. A method of producing an antibody, comprising culturing the host cell of claim 34 under conditions that result in production of the antibody, and isolating the antibody from the host cell or culture.

 36. A method of treating a condition associated with Trop-2 expression in a
20 subject comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 31.

 37. The method of claim 36, wherein the condition is a cancer.

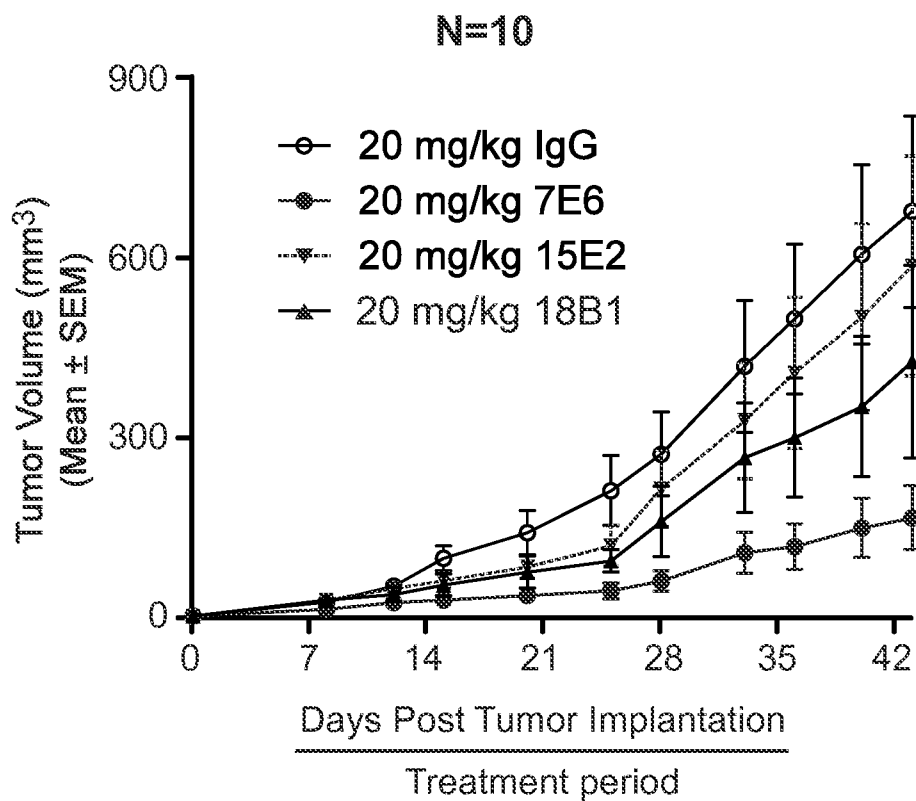
 38. The method of claim 37, wherein the cancer is selected from the group consisting of bladder, breast, cervical, choriocarcinoma, colon, esophageal, gastric,
25 glioblastoma, head and neck, kidney, lung, oral, ovarian, pancreatic, prostate, and skin cancer

39. A method of inhibiting tumor growth or progression in a subject who has a Trop-2 expressing tumor, comprising administering to the subject in need thereof an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 31 to the subject.

5 40. A method of inhibiting metastasis of Trop-2 expressing cancer cells in a subject, comprising administering to the subject in need thereof an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 31 to the subject.

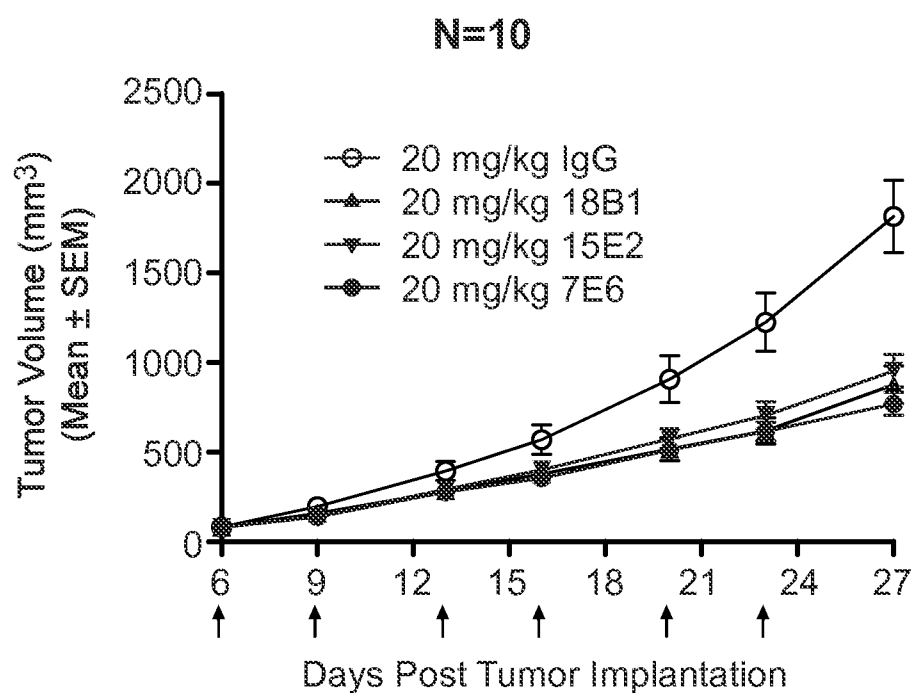
41. A method of induce tumor regression in a subject who has a Trop-2 expressing tumor, comprising administering to the subject in need thereof an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 31 to the subject.

1/19

Figure 1

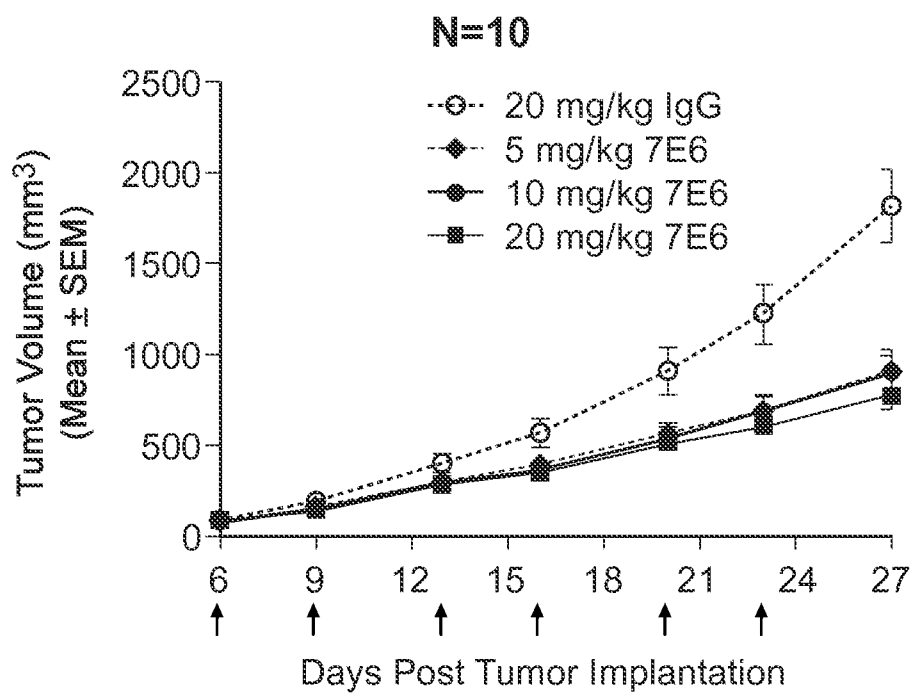
antibody treatment	Mean tumor volume (mm ³) on day 43	TGI (Tumor growth inhibition)
control IgG	673.0	0%
7E6	163.8	76%
15E2	582.0	14%
18B1	423.5	37%

2/19

Figure 2A

antibody treatment	Mean tumor volume (mm ³) on day 27	TGI (Tumor growth inhibition)
control IgG	1814.8	0%
7E6	770.7	58%
15E2	953.6	47%
18B1	875.5	52%

3/19

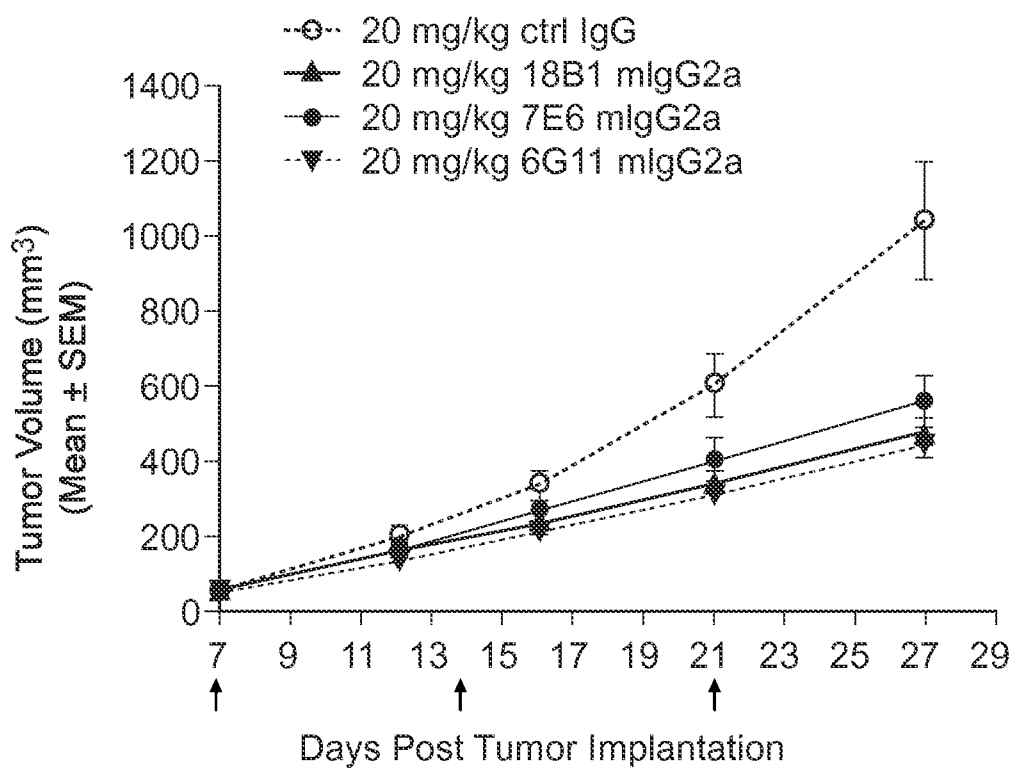
Figure 2B

antibody treatment	Mean tumor volume (mm3) on day 27	TGI (Tumor growth inhibition)
control IgG	1814.8	0%
7E6-5mg/kg	913.9	50%
7E6-10mg/kg	897.7	51%
7E6-20mg/kg	875.5	52%

4/19

Figure 2C

N=10

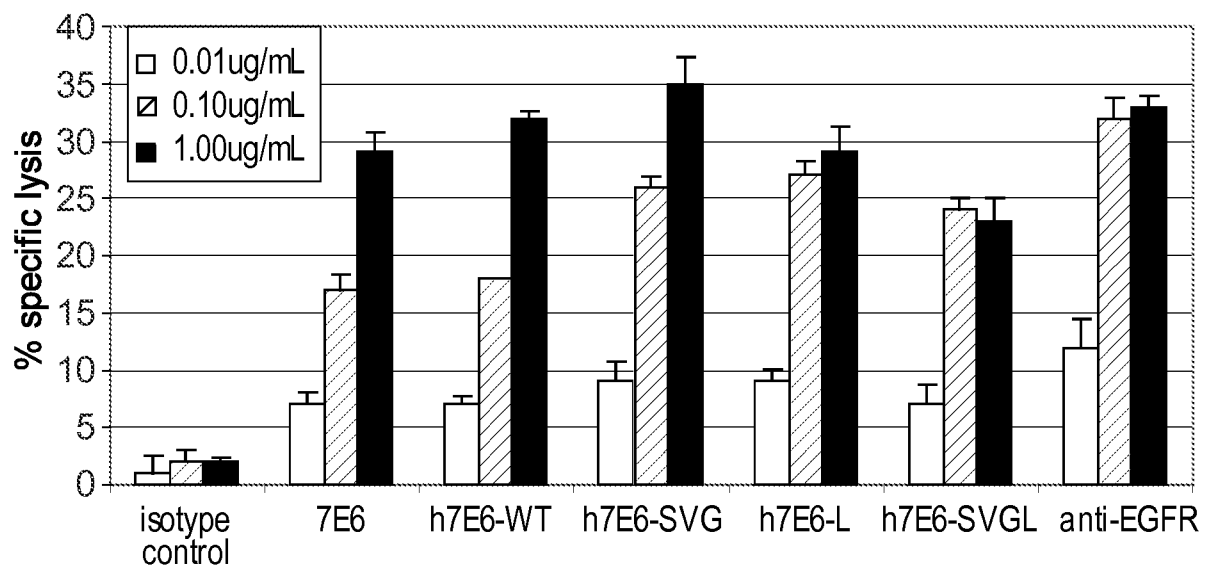


antibody treatment	Mean tumor volume (mm3) on day 27	TGI (Tumor growth inhibition)
control IgG	1044.0	0%
6G11	444.8	57%
7E6	561.0	46%
18B1	477.6	54%

5/19

Figure 3

antibody	% specific lysis		
	0.01ug/mL	0.10ug/mL	1.00ug/mL
isotope control	1 ± 1.6	2 ± 1.0	2 ± 0.4
7E6	7 ± 1.1	17 ± 1.4	29 ± 1.8
h7E6-WT	7 ± 0.8	18 ± 0.0	32 ± 0.6
h7E6-SVG	9 ± 1.7	26 ± 0.9	35 ± 2.3
h7E6-L	9 ± 1.1	27 ± 1.3	29 ± 2.3
h7E6-SVGL	7 ± 1.8	24 ± 1.0	23 ± 2.1
anti-EGFR	12 ± 2.4	32 ± 1.7	33 ± 0.9

ADCC activity of anti-human Trop2 Abs on A431 cells

6/19

Figure 4

	1		50
hTrop1	(1)	MA-----PPQVLAFGLLAAATATFAAAQEECV	CENYKAVNCFVNNN
hTrop2	(1)	MARGPGLAPPELRIPLLLLLAAVTGHTAAQ	NCTCPTNKTVCSPDGP
Consensus	(1)	PP L LLL AA AAQD C C KL V	
	51		100
hTrop1	(44)	RQCQCTSVGAQNTVICSCLA	KCLVMKAEMNCSKLGFRAK-P-EGALQNN
hTrop2	(51)	GRCQCRAIGSGMAVDCSTLT	KCLLIKARMSAPKNARTLVREPSEHALVDN
Consensus	(51)	CQC ALGA V CS L AKCLLLKA M A K AR	P E AL N
	101		150
hTrop1	(92)	DGLYDPDCDESGLFKA	QCNGTSTCWCVNAGVRRTDK-DTEITCSEVR
hTrop2	(101)	DGLYDPDCOPEGREKA	QCNQTSVCWCVNSVGVRRTDKGDLSLRCDELVR
Consensus	(101)	DGLYDPDCD G FKAQCN TS CWCVNS	GVRRTDK D I C E VR
	151		200
hTrop1	(141)	TYWLTIELKHAREKPYDSKSLRTALQ	EITTRYQLDPKEITSLIYENNV
hTrop2	(151)	THHTILRLRHPTAGAHNSDLDAELR	PLFRERYRLHPKEFAAVHYEQPT
Consensus	(151)	TH IIIDLKHK F L L K RY L PKFI AI YEN	
	201		250
hTrop1	(191)	ITIELVQNSSOKTQNDVDIADVAYYFE	KDVKGESLFFHSKK-DLTVNGEQ
hTrop2	(201)	IQIELRQNTSOKAAGDVDICDAAYYFERD	KGESLFFQGGGLLRVRGE-
Consensus	(201)	I IDL QNSSQK DVDIAD AYYFEKDIKGESLF	K LDL V GE
	251		300
hTrop1	(240)	LDLDPGQTLIIYYVDEKAPFESMQGLKAGVIAVIVVVV	IAVAGIVVLVIS
hTrop2	(250)	-PLQYERTLIYYLDEIPEKFSMKRLTAG	LIAVIVVVVIALVAGMAVLVIT
Consensus	(251)	L TLIYYLDE P FSM L AGLIAVIVVVVIALVAGI	VLVIS
	301		325
hTrop1	(290)	RKKKMAKYEKAETKE	GEHPFLNA
hTrop2	(299)	NRKKSQKYKKVEIKE	GEIRKEPSL
Consensus	(301)	KKK AKY K EIKELGEL KE	

————— Domain 1 Domain 2
 — — — Domain 3 — . . — Domain 4

7/19

Figure 5

```

1                                     50
hTrop2 (1) MARGPGLAPPPLRLPLLLL LAAVTGHTAAQDNCTCPTNKMTVCSPDGPG
mTrop2 (1) MARGLDLAP----- LLLL LAMATRFCTAQSNCCTCPTNKMTVC DTNGPG
Consensus (51) MARG LAP LLLLLLA T AQ NCTCPTNKMTVC GPG

51                                     100
hTrop2 (51) GRCQCRAIGSGMAVDCSTLTSKCLLLKARMSAPKNAR LVRPSEHA VDN
mTrop2 (45) GVCQCRAIGSQ LVDCSTLTSKCLLLKARMSARKS R LVMPSEHA L DN
Consensus (51) G CQCRAIGS M VDCSTLTSKCLLLKARMSA K ARSLV PSEHA ILDN

101                                     150
hTrop2 (101) DGLYDPDCDPEGRFKARQCNQTSVCWCVN SVGVRRTDKGDLSLRCDELVR
mTrop2 (95) DGLYDPDCDDKGRFKARQCNQTSVCWCVN SVGVRRTDKGDQSLRCDELVR
Consensus (101) DGLYDPDCD GRFKARQCNQTSVCWCVN SVGVRRTDKGD SLRCDELVR

151                                     200
hTrop2 (151) THHILTLRHRPTAGAFNHSDLDAELRRLERERY LHPKFVA AVHYEQPT
mTrop2 (145) THHILTLRHRPTDRAFNHSDLDAELRRLRQERY LHPSEF SAVHYEPT
Consensus (151) THRILIDLHRPT AFNHSDLDAELRRLF ERYKLHP FLAAVHYE PT

201                                     250
hTrop2 (201) IQIELRQNTSOKAAGDVDI DAAYYFERDIKGESLFGGRGLDLVRGEP
mTrop2 (195) IQIELRQNASOK LRDVDI DAAYYFERDIKGESLFMRGLD VQVRGEP
Consensus (201) IQIELRQN SQKA DVDIADAAYYFERDIKGESLF GR GLDL VRGEP

251                                     300
hTrop2 (251) LQVERTLIYYLDEIPPKFSMKRLTAG IAVIVVVVA VAGAVLVITNR
mTrop2 (245) LHVERTLIYYLDEKPPQFSMKRLTAG IAVIAVVSVA VAGVVLVITKR
Consensus (251) L VERTLIYYLDE PP FSMKRLTAGLIAVI VV VALVAGM VLVIT R

301                                     323
hTrop2 (301) RKSGKYKKVE KELGE RKEPSL
mTrop2 (295) RKSGKYKKVE KELGE RSEPSL
Consensus (301) RKSGKYKKVEIKELGELR EPSL

```

_____ Domain 1 Domain 2
 — — — Domain 3 — . . — Domain 4

8/19

Figure 6A

		1		46
h7E6_VH	(1)	QVQLQESGPGLVPSSETLSITCTVSGSTSSYGVHWIRQPPGKGLE		
h7E6_VH_SVG	(1)	QVQLQESGPGLVPSSETLSITCTVSGSTSSYGVHWIRQPPGKGLE		
m7E6_VH	(1)	QVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLE		
Consensus	(1)	QVQLQESGPGLVKPSETLSITCTVSGGSIS <u>SYGVHWIRQPPGKGLE</u>		
		47		96
h7E6_VH	(47)	WIGVIWTEGGSTDYNSALMSRVTSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA		
h7E6_VH_SVG	(47)	WIGVIWTEGGSTDYNSALMSRVTSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA		
m7E6_VH	(47)	WIGVIWTEGGSTDYNSALMSRLSINKDNSKSOVFLKMNSLOTDDTAVYYCA		
Consensus	(47)	WIGVIWTEGGSTDYNSALMSRVTSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA		
		97	119	
h7E6_VH	(97)	RDGDYDRYTMDYWGQGTSTVTVSS		
h7E6_VH_SVG	(97)	RDGDYDRYTMDYWGQGTSTVTVSS		
m7E6_VH	(97)	RDGDYDRYTMDYWGQGTSTVTVSS		
Consensus	(97)	<u>RDGDYDRYTMDYWGQGT</u> LVTVSS		

Figure 6B

		1		46
h7E6_VL	(1)	DIVLTQSPDSLAIVSLGERATINCRAKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQ		
h7E6_VL_L	(1)	DIVLTQSPDSLAIVSLGERATINCRAKSVSTSLYSYMHWYQQKPGQ		
h7E6_VL_N	(1)	DIVLTQSPDSLAIVSLGERATINCRAKSVSTSNYSYMHWYQQKPGQ		
m7E6_VL	(1)	DIVLTQSPASLAIVSLGERATINCRAKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQ		
Consensus	(1)	DIVMTQSPDLSLAIVSLGERATINCRAKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQ		
		47		96
h7E6_VL	(47)	PPKLLIYLASNLESGVPRFSGSGSGTDFTLTISGLQAEDVAVYYCQHSR		
h7E6_VL_L	(47)	PPKLLIYLASNLESGVPRFSGSGSGTDFTLTISGLQAEDVAVYYCQHSR		
h7E6_VL_N	(47)	PPKLLIYLASNLESGVPRFSGSGSGTDFTLTISGLQAEDVAVYYCQHSR		
m7E6_VL	(47)	PPKLLIYLASNLESGVPRFSGSGSGTDFTLTISGLQAEDVAVYYCQHSR		
Consensus	(47)	PPKLLIYLASNLESGVPRFSGSGSGTDFTLTISGLQAEDVAVYYCQHSR		
		97	111	
h7E6_VL	(97)	ELPYTFGGGTKLEIK		
h7E6_VL_L	(97)	ELPYTFGGGTKLEIK		
h7E6_VL_N	(97)	ELPYTFGGGTKLEIK		
m7E6_VL	(97)	ELPYTFGGGGTKLEIK		
Consensus	(97)	<u>ELPYTFGGG</u> GTKLEIK		

9/19

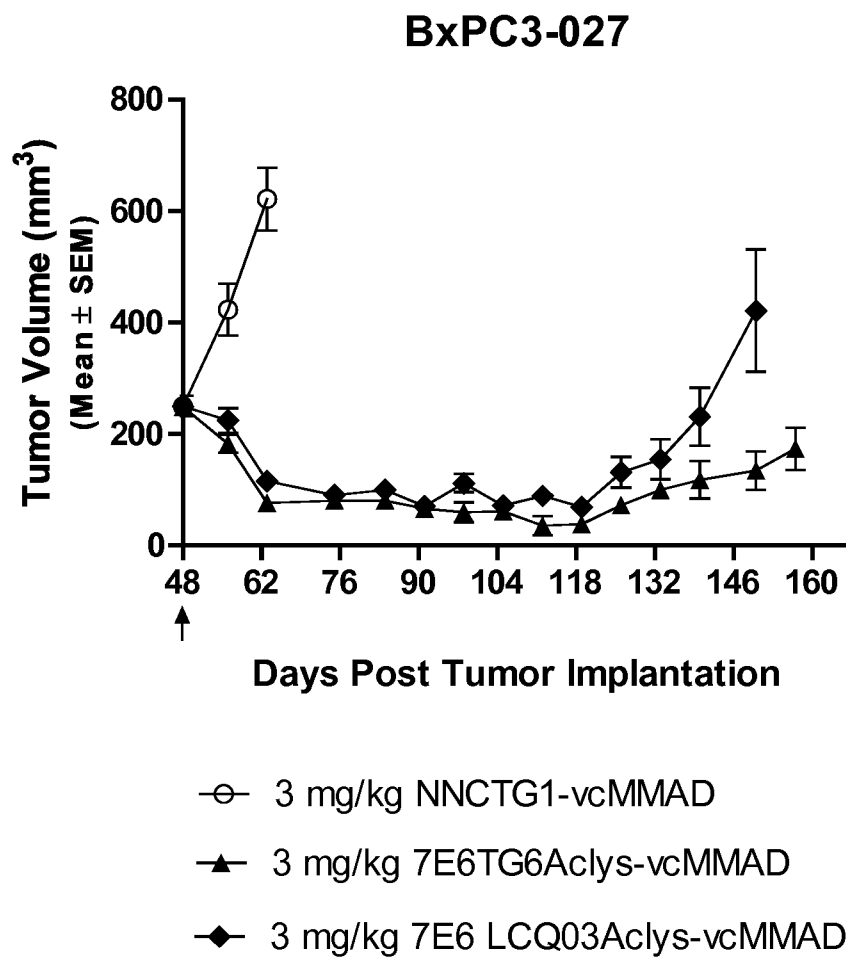
Figure 7A

		1	46
h6G11_VH	(1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVQAPGQGLE	
h6G11_VH_FKG	(1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVQAPGQGLE	
m6G11_VH	(1)	QVQLQQPGAEVLRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVQAPGQGLE	
Consensus	(1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLE	
		47	96
h6G11_VH	(47)	WIGNIIPSDSYSNYNKFKDRVTMTDRSTSTVYMELSSLRSEDFAVYYC	
h6G11_VH_FKG	(47)	WIGNIFPSDSYSNYNKFKDRVTMTDRSTSTVYMELSSLRSEDFAVYYC	
m6G11_VH	(47)	WIGNIPSDSYSNYNKFKDKATLVDRSSSTAYMQVSSPTSEDSAVYYC	
Consensus	(47)	WMGNIYPSDSYSNYNQKFKDRVTMTDRDTSTSTVYMELSSLRSEDFAVYYC	
		97	115
h6G11_VH	(97)	ARGSSFDYWGQGTITVTVSS	
h6G11_VH_FKG	(97)	ARGSGFDYWGQGTITVTVSS	
m6G11_VH	(97)	TYGSSFDYWGQGTITVTVSS	
Consensus	(97)	ARGSSFDYWGQGTITVTVSS	

Figure 7B

		1	46
h6G11_VL	(1)	EIVLTQSPAILSLSPGERATLSCRASQTIGTSIHWYQQKPGQAPRL	
h6G11_VL_SF	(1)	EIVLTQSPAILSLSPGERATLSCRASQTIGTSIHWYQQKPGQAPRL	
m6G11_VL	(1)	DILLTQSPAILSVSPGERVTFSCRASQTIGTSIHWYQQRTNGSPRL	
Consensus	(1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTIGTSIHWYQQKPGQAPRL	
		47	96
h6G11_VL	(47)	LIYYASESISGIPRFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQSSSWPF	
h6G11_VL_SF	(47)	LIYYASESISGIPRFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQSSSWPF	
m6G11_VL	(47)	LIYYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQSSSWPF	
Consensus	(47)	LIYYASESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQSSNSWPF	
		97	107
h6G11_VL	(97)	TFGQGTKLEIK	
h6G11_VL_SF	(97)	TFGQGTKLEIK	
m6G11_VL	(97)	TFGQGTKLEIK	
Consensus	(97)	TFGQGTKLEIK	

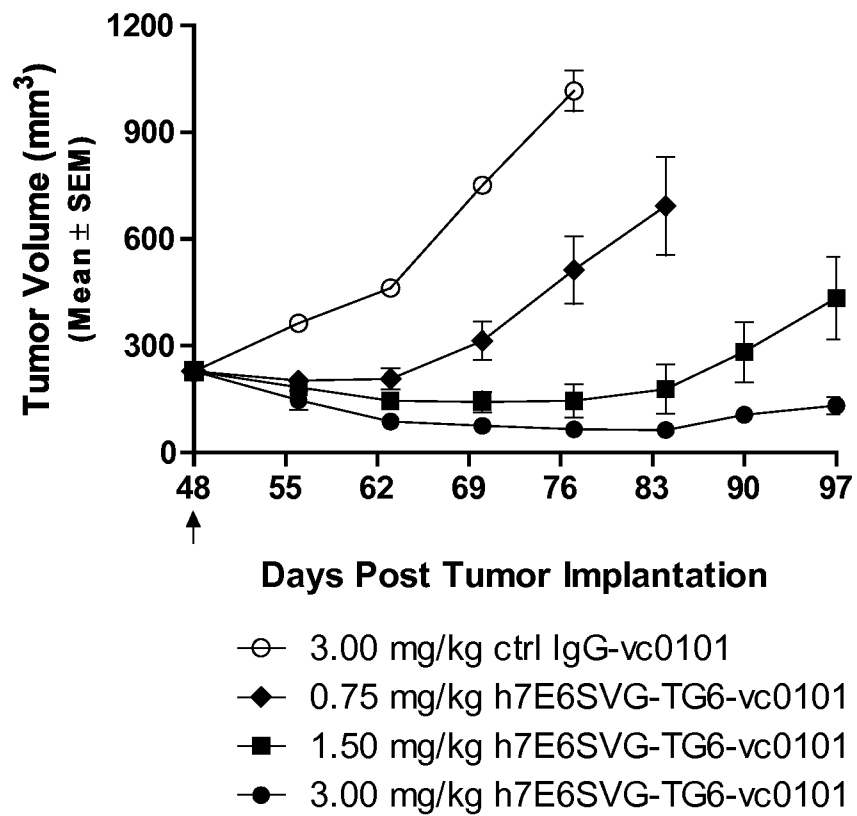
10/19

Figure 8

11/19

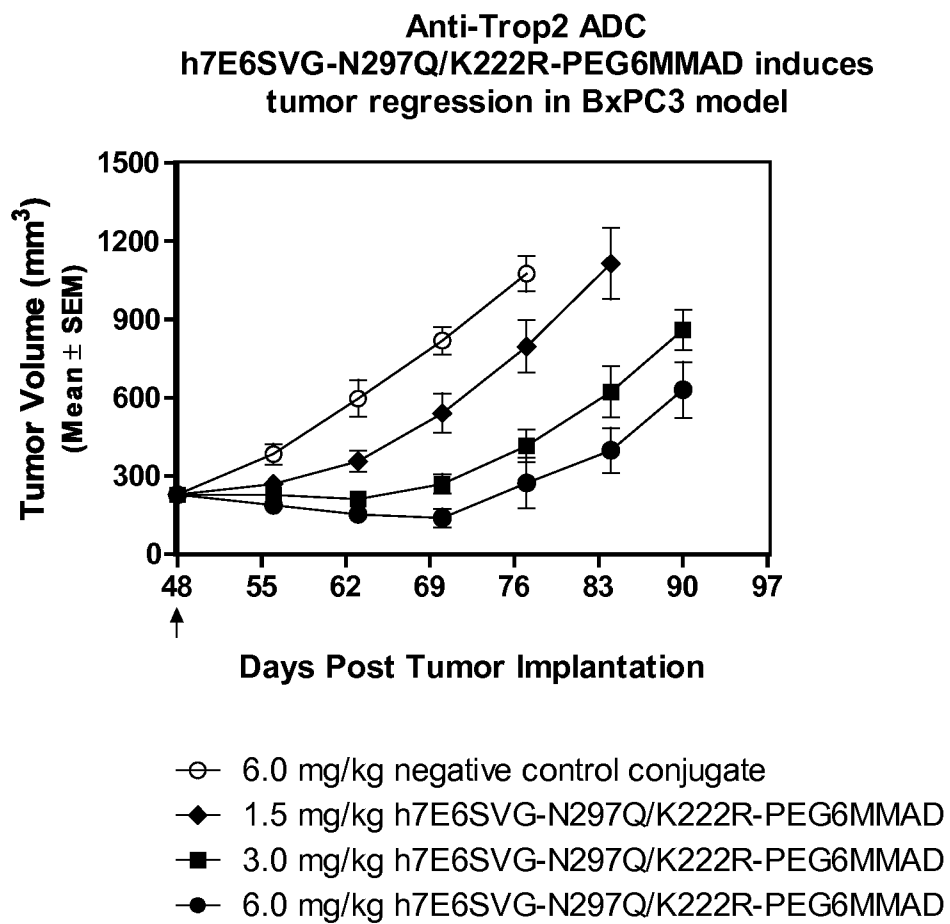
Figure 9A

Anti-Trop2 ADC h7E6SVG-TG6-vc0101 induces tumor regression in BxPC3 model



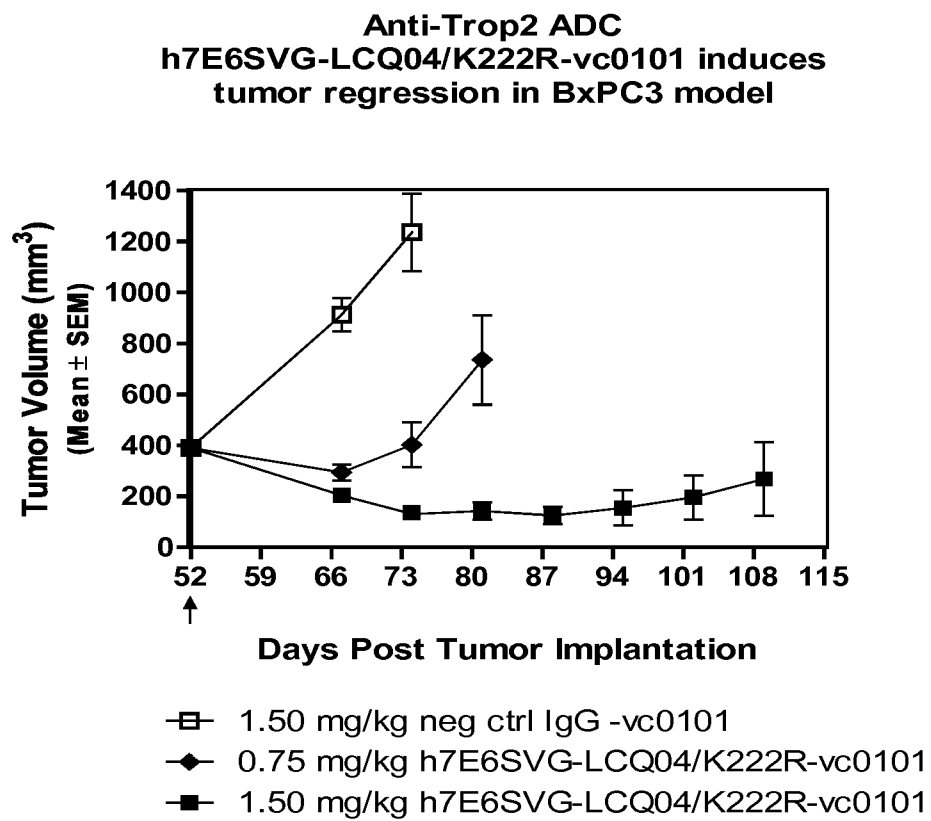
12/19

Figure 9B



13/19

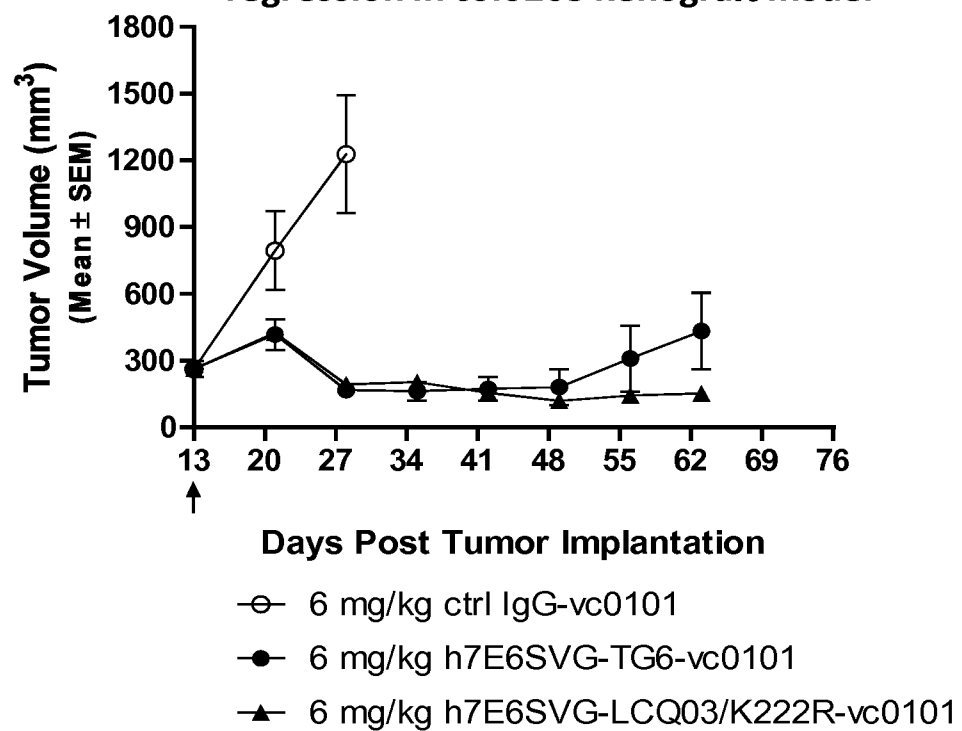
Figure 9C



14/19

Figure 10

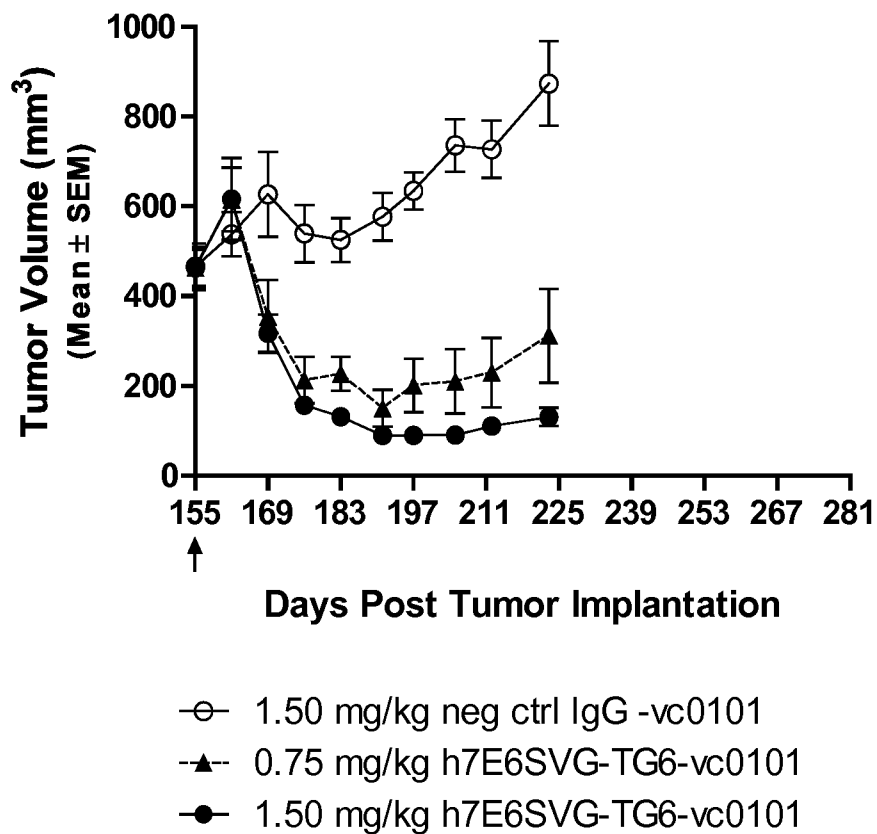
**h7E6SVG-TG6-vc0101 and
h7E6SVG-LCQ03/K222R-vc0101 induce tumor
regression in colo205 xenograft model**



15/19

Figure 11

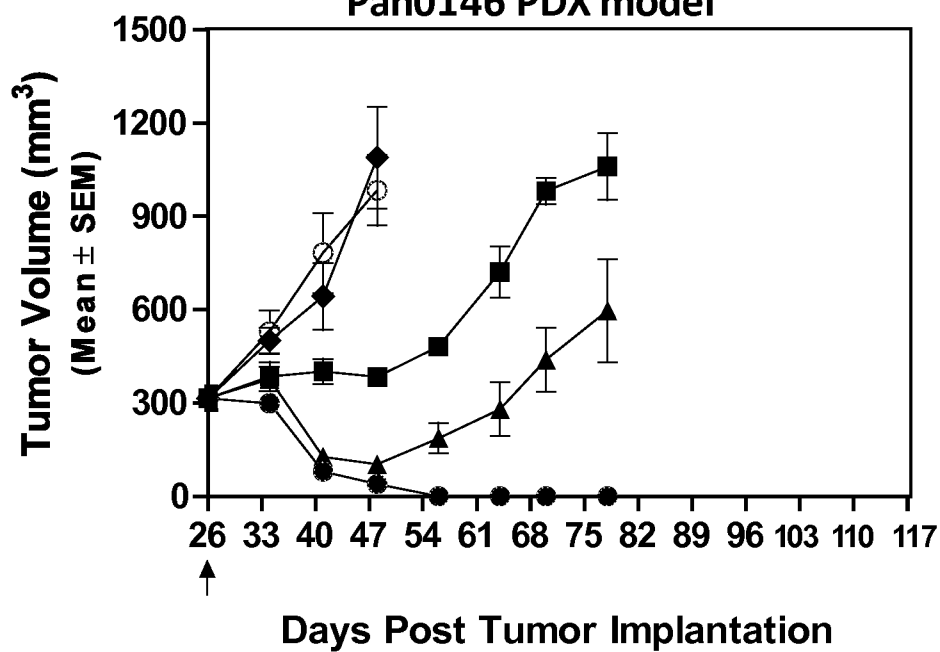
**h7E6SVG-TG6-vc0101 induces tumor regression in
Ova196756 PDX model**



16/19

Figure 12A

**h7E6SVG-TG6-vc0101 induces tumor regression in
Pan0146 PDX model**

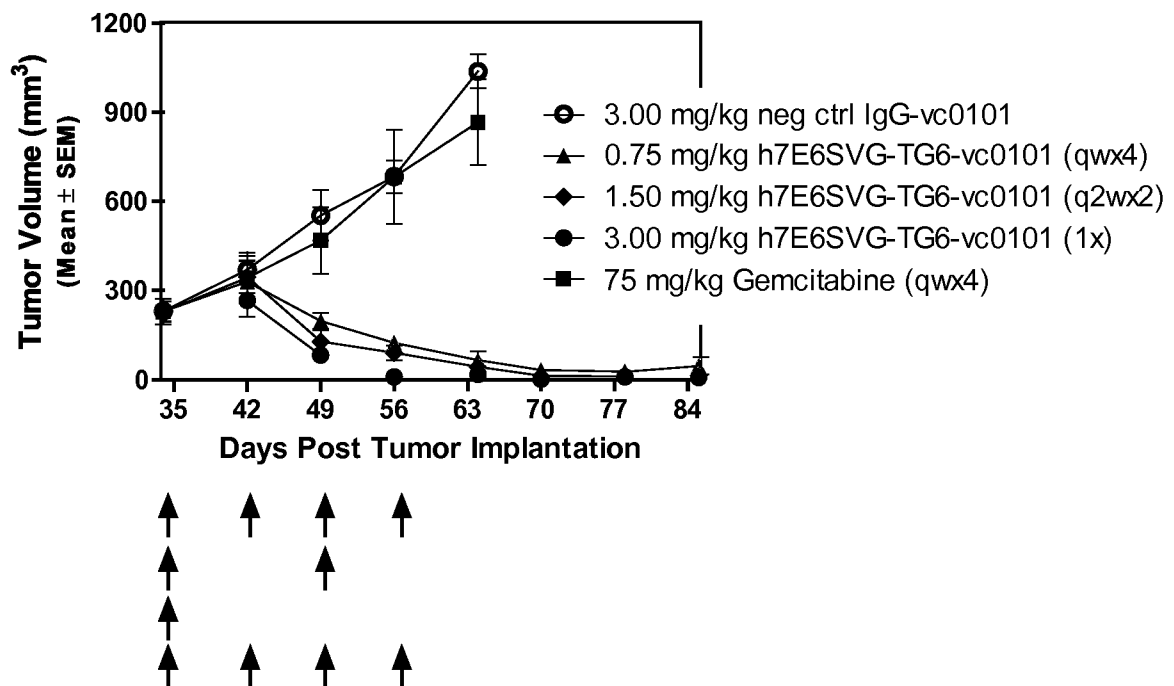


- 3.00 mg/kg ctrl IgG-vc0101
- ◆ 0.75 mg/kg h7E6SVG-TG6-vc0101
- ▲ 1.50 mg/kg h7E6SVG-TG6-vc0101
- 3.00 mg/kg h7E6SVG-TG6-vc0101
- 75 mg/kg Gemcitabine (2qw)
6 doses

17/19

Figure 12B

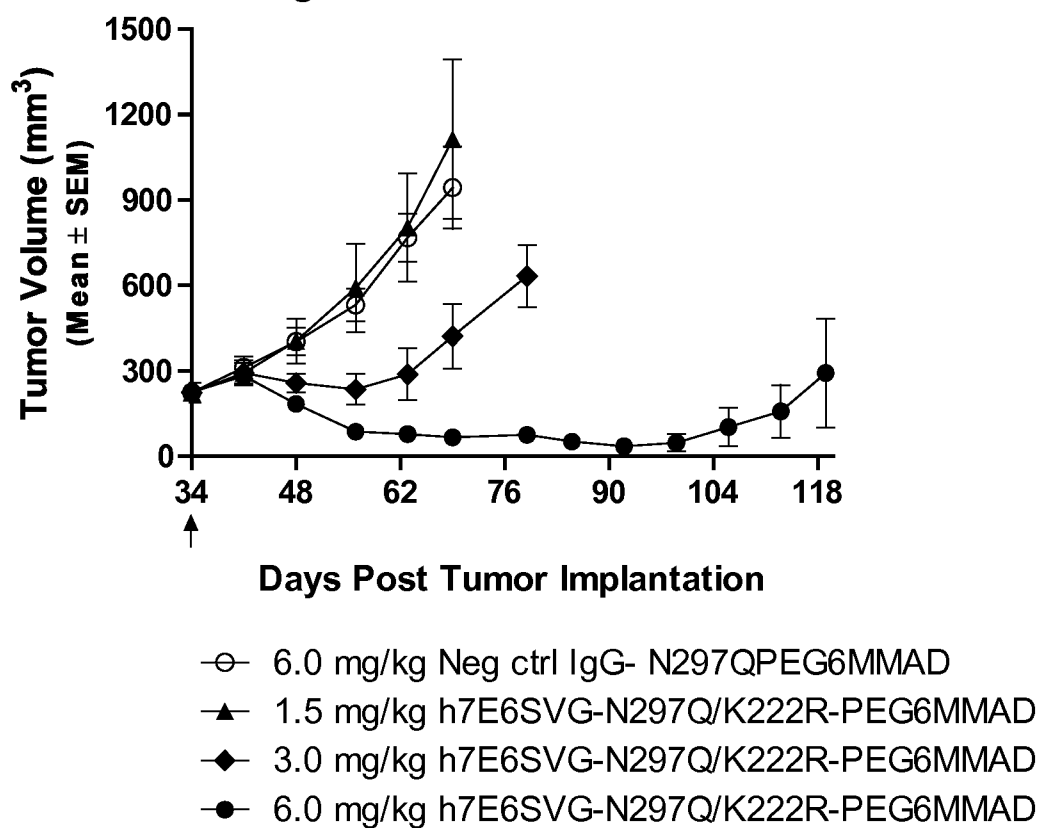
**h7E6SVG-TG6-vc0101 induces long term tumor regression in
Pan0146 PDX model through continued dosing**



18/19

Figure 13

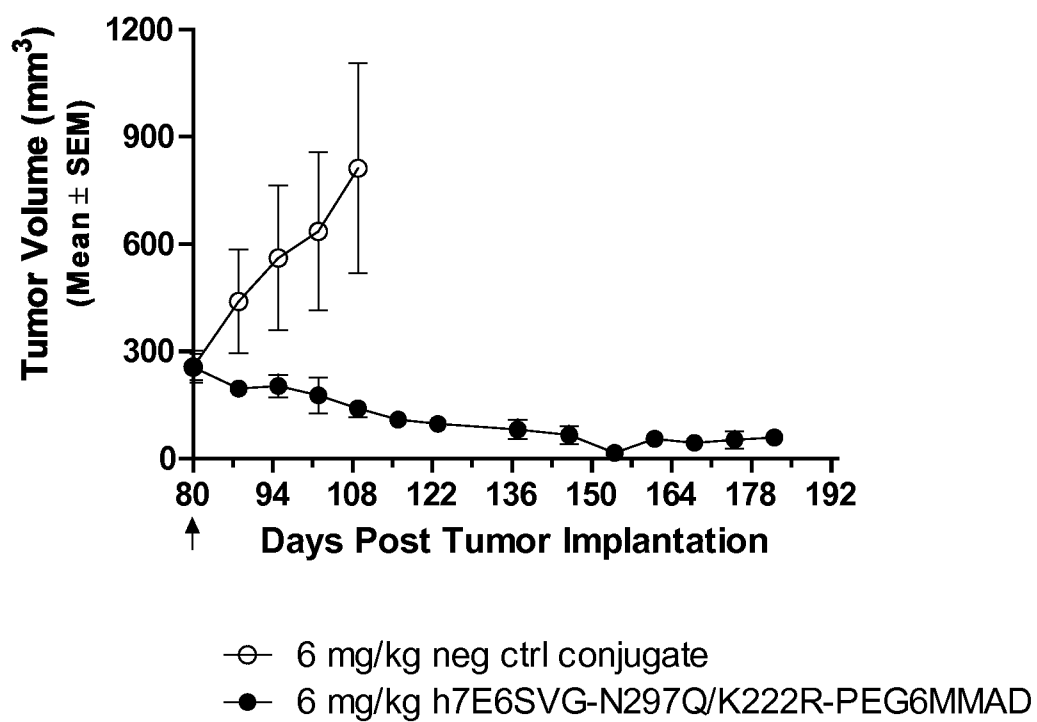
h7E6SVG N297Q/K222R PEG6MMAD induces tumor regression in Pan144607 PDX model



19/19

Figure 14

**h7E6SVG-N297Q/K222R induces tumor regression
in Pan0135 PDX model**



ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA TROP-2 Y SUS USOS

71866Nov2012

Solicitudes Relacionadas

5 La presente solicitud reclama los beneficios de la
Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/559,015
presentada el 11 de noviembre de 2011, la Solicitud Provisional
de los Estados Unidos No. 61/640,641 presentada el 30 de Abril
de 2012, y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No.
10 61/717,288 presentada el 23 de octubre de 2012 las cuales
están incorporadas a la presente mediante referencia en su
totalidad.

Campo

15

La presente invención se refiere a anticuerpos, por
ejemplo, anticuerpos de extensión completa o fragmentos de
enlace antígeno de los mismos, que se enlazan de manera
específica a antígeno de la superficie celular de trofoblasto
20 (Trop-2). La invención se refiere además conjugados de
anticuerpo (por ejemplo, conjugados fármaco-anticuerpo) que
comprende los anticuerpos Trop-2, composiciones que
comprende los anticuerpos Trop-2, y métodos para usar los
anticuerpos Trop-2 y sus conjugados para tratar condiciones
25 asociadas con la expresión de Trop-2 (por ejemplo, cáncer).

Antecedentes

El antígeno de la superficie celular de trofoblasto (Trop-
30 2), referido también como M1S1, GA733-1 (antígeno gástrico
733-1), EGP-1 (glicoproteína epitelial -1), o TACSTD2
(transductor de señal de calcio tumor-asociado), es una

glicoproteína de superficie celular identificada originalmente en trofoblasto placentario humano y encontrado de manera subsecuente por ser altamente expresado en la mayoría de los carcinomas humanos, aunque mostró una expresión restringida o limitada en tejidos de adulto normales. Véase, por ejemplo, Varughese et al., *Gynecologic Oncology*, 122:171-177, 2011. Trop-2 es altamente conservado entre las especies. Por ejemplo, la proteína Trop-2 humana comparte 79% de identidad con la proteína Trop-2 de murino. Véase Cubas et al., *Molecular Cancer*, 9:253, 2010. Aunque el rol biológico de Trop-2 aún no está bien explicado, varios estudios han demostrado que la sobreexpresión de Trop-2 se correlaciona con la incrementada agresividad de tumor, metástasis, y un mal pronóstico en varios carcinomas humanos, tales como cáncer de colon, cáncer de ovario, y cáncer pancreático. Véase por ejemplo, Fang et al., *Int. J. Colorectal Dis*, 24:875-884, 2009; Bignotti et al., *Eur. J. Cancer*, 46:944-953, 2010; and Fong et al., *Br J Cancer*, 99:1290-1295, 2008. Los estudios han demostrado también que Trop-2 contribuye a patogénesis de tumor al menos en parte mediante la activación de la vía ERK1/2 MAPK lo cual tiene importantes implicaciones en la proliferación, migración, invasión y sobrevivencia de célula cancerígena. Véase Cubas et al., 2010, supra.

La sobreexpresión de las células de tumor epitelial Trop-2 y su ubicación transmembrana convierten a Trop-2 en un objetivo atractivo para la inmunoterapia del cáncer. En consecuencia, un anticuerpo de alta afinidad para Trop-2, en particular para Trop-2 humano, formaría un agente terapéutico superior para el tratamiento del cáncer en pacientes humanos. Aunque se han descrito varios anticuerpos Trop-2 (Véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 7,420,041 (anticuerpo AR47A6.4.2), Patente de los Estados Unidos No. 5,850,854 (anticuerpo BR110), Patente de los Estados Unidos No. 6,653,104 (anticuerpo RS7), y Patente de los Estados Unidos No. 7,517,964 (anticuerpo RS7), US2012/0237518), ha sido extremadamente difícil identificar anticuerpos monoclonales que tengan alta afinidad, alta especificidad, y potente citotoxicidad o

actividad de eliminación/inhibición/regresión de tumor. Existe aún la necesidad de anticuerpos y otros agentes inmunoterapéuticos (tales como conjugados anticuerpo-fármaco) dirigidos contra Trop-2 que tienen eficacia modificada y perfil de seguridad, y que son adecuados para uso con pacientes humanos.

Breve Descripción

La invención aquí descrita está dirigida a anticuerpos y conjugados de anticuerpo (por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco) que se enlazan a Trop-2. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o conjugado de anticuerpo que se enlaza de manera específica al dominio 3 (por ejemplo, residuos de aminoácido 152-206) y el dominio 4 (por ejemplo, residuos de aminoácido 209-274) de Trop-2 humano (NO ID SEC: 27) con una afinidad de enlace de anticuerpo monovalente (K_D) de aproximadamente 6.5 nM o menos como se midió por medio de resonancia plasmónica de superficie.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, que se enlaza de manera específica a Trop-2, en donde el anticuerpo comprende a) una región variable de cadena pesada (VH) complementaria que determina regiones que comprenden (i) una región de determinación complementaria (CDR1) VH que comprende la secuencia SYGVH (NO ID SEC: 30), GGSIS7SY (NO ID SEC: 36), o GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37); (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia VIW₁TX₁GX₂TDYNSALMX₃, en donde X₁ es G o S; X₂ es S o V; X₃ es S o G (NO ID SEC: 49), o WTX₁GX₂ en donde X₁ es G o S, X₂ es S o V (NO ID SEC: 50); y (iii) una CDR3 VH que comprende la secuencia DGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 35); DYDRYTX₁DY, en donde X₁ es E o M (NO ID SEC: 82); o

DYDRYTX₁DY, en donde X₁ es cualquier aminoácido de presencia natural, por ejemplo, A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, o V (NO ID SEC: 83) y/o b) una región variable de cadena ligera (VL) complementaria que determina regiones que comprenden (i) una CDR1 VL que comprende la secuencia RASKSVSTSX₁YSYMH, en donde X₁ es G, L, o N (NO ID SEC: 63); (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia LASNLES (NO ID SEC: 55); y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia VLQHSRELPYT (NO ID SEC: 56). En ciertas modalidades, el anticuerpo no comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWL
 GVIWTGGSTDYNSALMSRLSINKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCA
 RDGDYDRYTMDYWGGGTSVTVSS (NO ID SEC: 2) y una región variable de cadena ligera de la secuencia

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWWYQQKPGQPP
 KLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRE
 LPYTFGGGTKLEIK (NO ID SEC: 1).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, el cual se enlaza de manera específica a Trop-2, en donde el anticuerpo comprende: una región VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en NO ID SEC: 5, 84 u 85; y/o una región VL que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en NO ID SEC: 3 o 6. En ciertas modalidades, la región VH comprende (i) una CDR1 VH que comprende la secuencia SYGVH (NO ID SEC: 30), GGSISSY (NO ID SEC: 36), o GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37); (ii) a VH CDR2 que comprende la secuencia VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) o WTSGV (NO ID SEC: 39); y (iii) una CDR3 VH que comprende la secuencia DGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 35) o DYDRYTX₁DY, en donde X₁ es E o M (NO ID SEC: 82). En ciertas modalidades, la región VL comprende (i) una CDR1 VL que comprende la secuencia RASKSVSTSGYSYMH (NO ID SEC: 54) o RASKSVSTSLYSYMH (NO

ID SEC: 57); (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia LASNLES (NO ID SEC: 55); y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia QHSRELPYT (NO ID SEC: 56). En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende (a) CDRs de cadena pesada que comprende: (i) una CDR1 que comprende la secuencia SYGVH (NO ID SEC: 30), GGSISSY (NO ID SEC: 36), o GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37); (ii) una CDR2 que comprende la secuencia VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) o WTSGV (NO ID SEC: 39); y (iii) una CDR3 que comprende la secuencia DGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 35) DYDRYTMDY (NO ID SEC: 99), o DYDRYTEDY (NO ID SEC: 100); y b) CDRs de cadena ligera que comprende (i) una CDR1 que comprende la secuencia RASKSVSTSGYSYMH (NO ID SEC: 54) o RASKSVSTSLYSYMH (NO ID SEC: 57); (ii) una CDR2 que comprende la secuencia LASNLES (NO ID SEC: 55); y (iii) una CDR3 que comprende la secuencia QHSRELPYT (NO ID SEC: 56). En ciertas modalidades, la región VH que comprende la secuencia mostrada en NO ID SEC: 5, 84 u 85 o una variante con una o más sustituciones de aminoácido conservadoras en residuos que no están dentro de una CDR y/o la región VL comprende la secuencia de aminoácido mostrada en NO ID SEC: 3, 6 o una variante de la misma con una o varias sustituciones aminoácido en aminoácidos que no están dentro de una CDR. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena ligera que contiene la secuencia mostrada en NO ID SEC: 66 y/o una cadena pesada que comprende la secuencia mostrada en NO ID SEC: 65. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región VH producida por el vector de expresión con No. de Acceso ATCC PTA-12872. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región VL producida por el vector de expresión con No de Acceso ATCC PTA-12871.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, que

se enlaza de manera específica al dominio 1 (por ejemplo residuos de aminoácido 31-71) de Trop-2 humano (NO ID SEC: 27) con una afinidad de enlace (KD) de aproximadamente 35 nM o menos como se midió a través de resonancia plasmónica de superficie.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, que se enlaza de manera específica a Trop-2, en donde el anticuerpo comprende a) una región variable de cadena pesada (VH) complementaria que determina regiones que comprenden (i) una
10 CDR1 VH que comprende la secuencia SYWIN (NO ID SEC: 40), GYTFTSY (NO ID SEC: 41), o GYTFTSYWIN (NO ID SEC: 42); (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia NIX₁PSDSYSN₂YX₂KFKD en donde X₁ es Y o F; X₂ es Q o K (NO ID SEC: 51), o X₁PSDSY en donde X₁ es Y o F (NO ID SEC: 52); y (iii)
15 una CDR3 VH que comprende la secuencia GSX₁FDY en donde X₁ es S o G (NO ID SEC: 53); y/o b) una región VL complementaria que determina regiones que comprenden (i) una CDR1 VL que comprende la secuencia RASQTIGTSH (NO ID SEC: 59); (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia YASESIS (NO ID SEC: 60); y
20 (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia X₁QX₂SWPFT en donde X₁ es Q o S; X₂ es N o F (NO ID SEC: 64).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, que se enlaza de manera específica a Trop-2, en donde el anticuerpo
25 comprende: una región VH que contiene una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en NO ID SEC: 13; y/o una región VL que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en NO ID SEC: 12. En ciertas modalidades, la región VH comprende (i) un CDR1 VH que comprende la
30 secuencia SYWIN (NO ID SEC: 40), GYTFTSY (NO ID SEC: 41), o GYTFTSYWIN (NO ID SEC: 42); (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia NIFPSDSYSN₂YX₂KFKD (NO ID SEC: 46) o FPSDSY (NO ID SEC: 47); y (iii) una CDR3 VH que comprende la secuencia GSGFDY (NO ID SEC: 48). En ciertas modalidades, la región VL

comprende (i) una CDR1 VL que comprende la secuencia RASQTIGTSIH (NO ID SEC: 59); (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia YASESIS (NO ID SEC: 60); y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia SQSFSPFT (NO ID SEC: 62). En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende (a) CDRs de cadena pesada que comprende: (i) una CDR1 que comprende la secuencia SYWIN (NO ID SEC: 40), GYTFTSY (NO ID SEC: 41), o GYTFTSYWIN (NO ID SEC: 42); (ii) una CDR2 que comprende la secuencia NIFPSDSYSNKNKKFKD (NO ID SEC: 46) o FPSDSY (NO ID SEC: 47); y (iii) una VH CDR3 que comprende la secuencia GSGFDY (NO ID SEC: 48); y b) CDRs de cadena ligera que comprende: (i) una CDR1 que comprende la secuencia RASQTIGTSIH (NO ID SEC: 59); (ii) una CDR2 que comprende la secuencia YASESIS (NO ID SEC: 60); y (iii) una CDR3 que comprende la secuencia SQSFSPFT (NO ID SEC: 62). En ciertas modalidades, la región VH comprende la secuencia mostrada en NO ID SEC: 13 o una variante con una o varias sustituciones aminoácido conservadoras en residuos que no están dentro de una CDR y/o la región VL comprende la secuencia de aminoácido mostrada en NO ID SEC: 12 o una variante de la misma con una o varias sustituciones aminoácido en aminoácidos que no están dentro de una CDR. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia mostrada en NO ID SEC: 68 y una cadena pesada que comprende la secuencia mostrada en NO ID SEC: 67.

En ciertas modalidades, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo quimérico. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante. En ciertas modalidades, el anticuerpo es de la subclase IgG1, IgG2 o IgG2Δa, IgG3, o IgG4 humano. En

ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante glicosilada. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante que tiene incrementada afinidad de enlace para un receptor gamma Fc humano.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se enlaza de manera específica a Trop-2 y compite con los anticuerpos como se describe en la presente (por ejemplo, m7E6, h7E6_SVG, h7E6_SVG4, h7E6_SVG19, h7E6_SVG6, h7E6_SVG20, h7E6_SVG22, h7E6_SVG28, h7E6_SVG30,
10 h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h7E6_SVGN, m6G11, h6G11, o h6G11_FKG_SF). En ciertas modalidades, el anticuerpo compite con h7E6_SVG y tienen una afinidad de enlace de anticuerpo monovalente (K_D) de aproximadamente 6.5 nM o menos como se
15 midió a través de resonancia plasmónica de superficie.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado del anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno como se describe en la presente, en donde el anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno es conjugado para un agente, en donde el agente es
20 seleccionado a partir del grupo que consta de un agente citotóxico, un agente inmunomodulador, un agente trazador para diagnóstico por imágenes, una proteína terapéutica, un biopolímero, y un oligonucleótido. En ciertas modalidades, el agente es un agente citotóxico (por ejemplo, monometil auristatina D (MMAD) u otras
25 auristatinas).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que comprende un marcador que contiene glutamina donador de acilo modificado genéticamente en un sitio específico del anticuerpo. En ciertas modalidades, el marcador comprende aminoácido glutamina
30 (Q) o una secuencia de aminoácido GLLQGG (NO ID SEC: 78), LLQGA (NO ID SEC: 79), o GLLQGA (NO ID SEC: 81) LLQ, o $LLQX_1X_2X_3X_4X_5$, en donde X_1 es G o P, en donde X_2 es A, G, P, o está ausente, en donde X_3 es A, G, K, P, o está ausente, en donde X_4 es G, K, o está ausente, y en donde X_5 es K o está ausente (NO

ID SEC: 88). En ciertas modalidades, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la presente comprende un marcador que contiene glutamina donador de acilo modificado genéticamente en un sitio específico, tal como G, GLLQGG (NO ID SEC: 78), LLQGA (NO ID SEC: 79), o GLLQGA (NO ID SEC: 81) , LLQ, o $LLQX_1X_2X_3X_4X_5$, en donde X_1 es G o P, en donde X_2 es A, G, P, o está ausente, en donde X_3 es A, G, K, P, o está ausente, en donde X_4 es G, K, o está ausente, y en donde X_5 es K o está ausente (NO ID SEC: 88).

En una variación, la invención proporciona un anticuerpo aislado que comprende un marcador que contiene glutamina donador de acilo y una modificación aminoácido en la posición 222, 340, o 370 del anticuerpo (esquema de numeración de Kabat), en donde la modificación es una eliminación, inserción, sustitución, mutación de aminoácido o cualquier combinación de las mismas. En ciertas modalidades, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la misma comprende el marcador que contiene glutamina donador de acilo (por ejemplo, Q, GLLQGG (NO ID SEC: NO:78), LLQGA (NO ID SEC:79), GLLQGA (NO ID SEC:81), LLQ, o $LLQX_1X_2X_3X_4X_5$, en donde X_1 es G o P, en donde X_2 es A, G, P, o está ausente, en donde X_3 es A, G, K, P, o está ausente, en donde X_4 es G, K, o está ausente, y en donde X_5 es K o está ausente (NO ID SEC: 88)) modificado genéticamente en un sitio específico (por ejemplo, en un extremo carboxilo de la cadena pesada o ligera o en otro sitio) del anticuerpo Trop-2 y una modificación aminoácido en la posición 222, 340, o 370 del anticuerpo (esquema de numeración de Kabat). En ciertas modalidades, la modificación aminoácido es una sustitución de lisina a arginina.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado del anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno como se describe aquí, en donde el conjugado comprende la fórmula: anticuerpo-(marcador que contiene glutamina donador de acilo)-(ligador)-(agente citotóxico), en donde el marcador que

contiene glutamina donador de acilo es modificado genéticamente en un sitio específico del anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno (por ejemplo, en un extremo carboxilo de la cadena pesada o la cadena ligera o en otro sitio), en donde el marcador es
 5 conjugado para un ligador (por ejemplo un ligador que contiene una o más aminas reactivas (por ejemplo, amina primaria NH_2)), y en donde el ligador es conjugado para un agente citotóxico (por ejemplo, MMAD u otras auristatinas).

En ciertas modalidades, el conjugado es seleccionado a partir
 10 del grupo que comprende 1) anticuerpo-LLQGA-(acetil-lisina-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo)-0101, en donde acetil-lisina-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo es AcLys-VC-PABC, y en donde 0101 es 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-
 15 [(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida; 2) anticuerpo-LLQGA-AcLys-VC-PABC-MMAD; 3) anticuerpo-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (NO ID SEC: 88)-AcLys-VC-PABC-0101; 4) anticuerpo -LLQ X₁X₂X₃X₄X₅ (NO ID SEC: 88)-AcLys-VC-PABC-MMAD; 5) anticuerpo -GLLQGG (NO ID SEC: 78)-AcLys-VC-PABC-
 20 0101; y 6) anticuerpo -GLLQGG (NO ID SEC: 78)-AcLys-VC-PABC-MMAD. En ciertas, modalidades, el conjugado comprende una sustitución aminoácido a partir de lisina para arginina en la posición 222. En ciertas modalidades, el conjugado comprende una eliminación de aminoácido lisina (K) en el extremo C de la cadena
 25 pesada del anticuerpo.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado del anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno como se describe en la presente, el conjugado comprende sustituciones aminoácido en las posiciones N297Q y K222R, un ligador que comprende amino-PEG6-
 30 propionilo, y un agente citotóxico (por ejemplo, MMAD u otras auristatinas).

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la

presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótido que codifica el anticuerpo Trop-2 como se describe en la presente. En ciertas modalidades, se proporciona un vector que comprende el polinucleótido.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped aislada que produce de manera recombinante el anticuerpo Trop-2 como se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar una condición asociada con la expresión de Trop-2 en un sujeto que comprende administrar al sujeto que necesita de la misma, una cantidad efectiva de la composición farmacéutica como se describe en la presente. En ciertas modalidades, la condición es un cáncer. En ciertas modalidades, el cáncer es seleccionado a partir del grupo que consta de cáncer de vejiga, de mama, cervical, coriocarcinoma, cáncer de colon, esofágico, gástrico, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, de riñón, pulmonar, oral, de ovarios, pancreático, de próstata, y de la piel.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento o progresión de tumor en un sujeto que tiene un tumor que expresa Trop-2, que comprende administrar al sujeto que necesita de la misma, una cantidad efectiva de la composición farmacéutica como se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir la metástasis de células cancerosas que expresan Trop-2 en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que necesita de la misma, una cantidad efectiva de la composición farmacéutica como se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inducir la regresión de tumor en un sujeto que tiene un tumor que expresa Trop-2, que comprende administrar a un

sujeto que necesita de la misma, una cantidad efectiva de la composición farmacéutica como se describe en la presente.

En ciertas modalidades, el anticuerpo o los conjugados como se describen en la presente pueden ser administrados parenteralmente en un individuo. En ciertas modalidades, el individuo es un ser humano.

En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente no comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia

10 QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWL
GVIWTGGSTDYNSALMSRLSINKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCA
RDGDYDRYTMDYWGGQTSVTVSS (NO ID SEC: 2) y una región
variable de cadena ligera de la secuencia
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGQPP
15 KLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRE
LPYTFGGGTKLEIK (NO ID SEC: 1).

Breve Descripción de las Figuras/Dibujos

20 La Figura 1 muestra estudios de eficacia *in vivo* de varios anticuerpos de ratón Trop-2 (7E6, 15E2, and 18B1) en modelo de xenoinjerto Colo205 de expresión de objetivo.

La Figura 2A muestra estudios de eficacia *in vivo* de varios anticuerpos de ratón Trop-2 (7E6, 15E2, y 18B1) en modelo de xenoinjerto A431 de expresión de objetivo.

La Figura 2B muestra la inhibición de crecimiento de tumor de Xenoinjerto A431 mediante anticuerpo 7E6 Trop-2 en un estudio de respuesta de dosis.

La Figura 2C muestra la inhibición de crecimiento de tumor de Xenoinjerto A431 por medio de los anticuerpos 6G11, 7E6, y 18B1 Trop-2 en el modelo de xenoinjerto A431.

La Figura 3 muestra la actividad ADCC de anticuerpos 7E6 Trop-2 quiméricos y humanizados en células A431. 7E6 corresponde al anticuerpo 7E6 Trop-2 quimérico (por ejemplo el

anticuerpo que comprende los NOs ID SEC: 2 y 3), h7E6-WT corresponde a un anticuerpo que comprende NOs ID SEC: 4 y 3, h7E6-SVG corresponde a un anticuerpo que comprende NOs ID SEC: 5 y 3, h7E6-L corresponde a un anticuerpo que
 5 comprende NOs ID SEC: 4 y 6, h7E6-SVGL corresponde a un anticuerpo que comprende NOs ID SEC: 5 y 6, y anti-EGFR (Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico) que corresponde a un anticuerpo de control positivo.

La Figura 4 muestra la alineación de secuencia de
 10 aminoácido entre Trop-1 humano (NO ID SEC: 29) y Trop-2 humano (NO ID SEC: 27), y la secuencia de consenso (NO ID SEC: 69).

La Figura 5 muestra la alineación de secuencia de
 15 aminoácido entre Trop-2 humano (NO ID SEC: 27) y Trop-2 de ratón (NO ID SEC: 28), y la secuencia de consenso (NO ID SEC: 70).

La Figura 6A muestra la alineación de secuencia de
 aminoácido de las regiones variables de cadena pesada de los anticuerpos h7E6 Trop-2 (NO ID SEC: 4), h7E6_SVG (NO
 20 ID SEC: 5), y m7E6 (NO ID SEC: 2), y su secuencia de consenso (NO ID SEC: 71).

La Figura 6B muestra la alineación de secuencia de
 aminoácido de las regiones variables de cadena ligera de los anticuerpos h7E6 VL Trop-2 (NO ID SEC: 3), h7E6 VL L (NO
 25 ID SEC: 6), h7E6 VL N (NO ID SEC: 7), y m7E6_VL (NO ID SEC: 1), y su secuencia de consenso (NO ID SEC: 72).

La Figura 7A muestra la alineación de secuencia de
 aminoácido de las regiones variables de cadena pesada de los anticuerpos h6G11 Trop-2 (NO ID SEC: 11),
 30 h6G11_FKG_SF (NO ID SEC: 13), and m6G11 (NO ID SEC: 9), y su secuencia de consenso (NO ID SEC: 73).

La Figura 7B muestra la alineación de secuencia de
 aminoácido de las regiones variables de cadena ligera de los anticuerpos h6G11 Trop-2 (NO ID SEC: 10), h6G11_FKG_SF

(NO ID SEC: 12), and m6G11 (NO ID SEC: 8), y su secuencia de consenso (NO ID SEC: 74).

La Figura 8 muestra que el anticuerpo Trop-2 (quimérico 7E6) conjugado para AcLys-vc-PABC-MMAD indujo regresión de tumor a largo plazo en el modelo de xenoinjerto BxPC3. AcLys-vc-PABC-MMAD corresponde a Acetil-Lisina-Valina-Citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo- Monometil Auristatina D. LCQ03 y TG6 corresponden a marcadores de transglutaminasa que contienen glutamina NOs ID SEC: 78 y 79, respectivamente. NNC-TG1-vcMMAD representa el anticuerpo de control conjugado para el marcador de transglutaminasa que contienen glutamina (NO ID SEC: 75) y vcMMAD.

La Figura 9A muestra que el anticuerpo (h7E6SVG) humanizado Trop-2 conjugado para vc0101 indujo la regresión en el modelo de xenoinjerto BxPC3 de tumor pancreático. Vc0101 corresponde a AcLys-vc-PABC-0101 (Acetil-Lisina-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo-(2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida). TG6 corresponde al marcador de transglutaminasa que contiene glutamina NO ID SEC: 79.

La Figura 9B muestra que el anticuerpo (h7E6SVG) Trop-2 humanizado que tiene sustituciones aminoácido en las posiciones 297 y 222 y conjugado para PEG6-MMAD indujo la regresión de tumor en modelo de xenoinjerto BxPC3 de tumor pancreático. PEG6-MMAD corresponde a (Propilen Glicol)6-propionil-MMAD.

La Figura 9C muestra que el anticuerpo (h7E6SVG) Trop-2 humanizado que tiene sustitución aminoácido en la posición 222 y conjugado para vc0101 indujo regresión de tumor en el modelo de xenoinjerto BxPC3 de tumor pancreático. LCQ04 corresponde a marcador de transglutaminasa que contiene glutamina NO ID SEC: 79. vc0101 corresponde a AcLys-vc-PABC-0101.

La Figura 10 muestra que el anticuerpo (h7E6SVG) Trop-2 humanizado conjugado para vc0101 indujo la regresión de tumor en

el modelo de xenoinjerto Colo205 de tumor colorectal. TG6 y LCQ03 corresponden al marcador de transglutaminasa que contiene glutaminas Nos ID SEC: 79 y 78, respectivamente.

La Figura 11 muestra que el anticuerpo (h7E6SVG) Trop-2 humanizado conjugado para vc0101 indujo la regresión de tumor en el modelo de xenoinjerto PDX Ova196756 de ovario. TG6 corresponde al marcador de transglutaminasa que contiene glutamina NO ID SEC: 79.

La Figura 12A muestra que el anticuerpo (h7E6SVG) Trop-2 humanizado conjugado para vc0101 tiene eficacia superior que gemcitabine para inducir la regresión de tumor en el modelo PDX pancreático Pan0146. TG6 corresponde al marcador de transglutaminasa que contiene glutamina NO ID SEC: 79 (igual que en la Figura 12B).

La Figura 12B muestra que la dosificación continua de anticuerpo (h7E6SVG) Trop-2 humanizado conjugado para vc0101 resultó en una regresión de tumor sostenida en el modelo de xenoinjerto PDX Pan0146 pancreático.

La Figura 13 muestra que una dosis individual del anticuerpo anti-Trop2 humanizado conjugado con PEG6-MMAD indujo la regresión de tumor en el modelo Pan144607 PDX pancreático.

La Figura 14 muestra que una dosis individual del anticuerpo anti-Trop2 humanizado conjugado con PEG6-MMAD indujo la regresión de tumor en el modelo Pan0135 PDX pancreático.

Descripción Detallada

La invención descrita en la presente proporciona anticuerpos y conjugados de anticuerpo (por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco) que se enlazan de manera específica a Trop-2 (por ejemplo, Trop-2 humano). La invención proporciona también polinucleótidos que codifican

estos anticuerpos, composiciones que comprenden estos anticuerpos, y métodos para elaborar y utilizar estos anticuerpos. La invención proporciona también métodos para tratar una condición asociada con la expresión de Trop-2 en un sujeto, tal como cáncer (por ejemplo, cáncer de colon, gástrico, de cabeza y
 5 cuello, pulmonar, de ovarios, y pancreático).

Técnicas Generales

10 La práctica de la presente invención empleará, a menos de que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e Inmunología, las cuales están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas están
 15 completamente explicadas en la literatura, tal como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic
 20 Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.);
 25 Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Galos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in
 30 Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd

and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using
 antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold
 Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The antibodies (M.
 Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers,
 5 1995).

Definiciones

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina
 10 susceptible de enlace específico a un objetivo, tal como un
 carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etcétera, a
 través de por lo menos un sitio de reconocimiento de
 antígeno, ubicado en una región variable de la molécula de
 inmunoglobulina. Como se usa en la presente, el término
 15 comprende no solamente anticuerpos monoclonales o
 policlonales intactos, sino también fragmentos de los mismos
 (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), de cadena simple (ScFv)
 y anticuerpos de dominio (que incluyen por ejemplo, por
 ejemplo, anticuerpos de tiburón y de camélido), y proteínas
 20 de fusión que comprenden un anticuerpo, y cualquier otra
 configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina
 que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un
 anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como
 IgG, IgA, o IgM (o sub-clase de los mismos), y no es
 25 necesario que el anticuerpo sea de cualquier clase particular.
 Dependiendo de la secuencia de aminoácido de anticuerpo de
 la región constante de sus cadenas pesadas, las
 inmunoglobulinas pueden ser asignadas a diferentes clases.
 Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA,
 30 IgD, IgE, IgG, y IgM, y varias de estas se pueden subdividir
 en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4,
 IgA1 y IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que
 corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas son
 llamadas alfa, delta, epsilon, gamma, y mu, respectivamente.

Son bien conocidas las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas.

El término "fragmento de enlace de antígeno" o "porción de
5 enlace de antígeno" de un anticuerpo, como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que retiene la habilidad para enlazarse de manera específica a un antígeno determinado (por ejemplo, Trop-2). Las funciones de
10 enlace de antígeno de un anticuerpo se pueden efectuar a través de fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de enlace comprendidos dentro del término "fragmento de enlace de antígeno" de un anticuerpo incluyen Fab; Fab'; F(ab')₂; un fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH₁; un fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un brazo individual de
15 un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio simple (dAb) (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), y una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

Un anticuerpo, un conjugado de anticuerpo, o un polipéptido que "se enlaza de manera preferible" o "se enlaza de manera
20 específica" (usado de manera intercambiable en la presente) a un objetivo (por ejemplo, proteína Trop-2) es un término bien conocido en la técnica, y los métodos para determinar dicho enlace específico o preferencial también son bien conocidos en la técnica. Se dice que una molécula exhibe "enlace específico" o "enlace
25 preferencial" si reacciona o se asocia más frecuentemente, con mayor rapidez, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo que se "enlaza de manera específica" o "se enlaza de manera preferencial" a un objetivo si se enlaza con
30 mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que con las que se enlaza a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se enlaza de manera específica o preferencial a un epítipo Trop-2 es un anticuerpo que se enlaza a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que

con las que se enlaza a otros epítopes Trop-2 o epítopes no-Trop-2. Se comprende también que mediante la lectura de esta definición, por ejemplo, un anticuerpo (o porción o epítope) que se enlaza de manera específica o preferencial a un primer objetivo puede o no enlazarse específica o preferencialmente a un segundo objetivo. Como tal, "enlace específico" o "enlace preferencial" no necesariamente requiere (aunque puede incluir) el enlace exclusivo. Por lo general, aunque no de forma necesaria, la referencia a enlace significa enlace preferencial.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera de anticuerpo o la región variable de la cadena pesada de anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Como se conoce en la técnica, cada una de las regiones variables de la cadena pesada y ligera consta de cuatro regiones de estructura (FR) conectadas por medio de tres regiones de determinación de complementariedad (CDRs) conocidas también como regiones hipervariables. Las CDRs en cada cadena son mantenidas juntas en estrecha proximidad por medio de las FRs y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de enlace antígeno de anticuerpos. Hay por lo menos dos técnicas para determinar las CDRs: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia de especies cruzadas (i.e., Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al., 1997, J. Molec. Biol. 273:927-948). Como se usa en la presente, una CDR puede referirse a CDRs definidas mediante cualquier enfoque o por medio de una combinación de ambos enfoques.

Una "CDR" de un dominio variable son los residuos de aminoácido dentro de la región variable que son identificados de acuerdo con las definiciones de Kabat, Chothia, la

acumulación tanto de Kabat como de Chothia, AbM, contacto, y/o definiciones de conformación o cualquier método de determinación de CDR bien conocido en la técnica. Las CDRs de anticuerpo pueden ser identificadas como las regiones hipervariables
5 originalmente definidas por Kabat et al. Véase, Kabat et al., 1992, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Las posiciones de las CDRs también pueden ser identificadas como las estructuras de ciclo estructural originalmente descritas por Chothia y otros. Véase por
10 ejemplo, Chothia et al., *Nature* 342:877-883, 1989. Otros enfoques para la identificación de CDR incluyen la "definición AbM", que es un compromiso entre Kabat y Chothia y es derivado utilizando el software de modelado de anticuerpo Oxford Molecular's AbM (ahora Accelrys®), o la "definición de contacto" de CDRs en base a los
15 contactos de antígeno observados, establecida en MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 262:732-745, 1996. En otro enfoque, referido en la presente como la "definición conformacional" de CDRs, las posiciones de las CDRs pueden ser identificadas como los residuos que hacen contribuciones entálpicas al enlace de antígeno. Véase
20 por ejemplo, Makabe et al., *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166, 2008. Incluso otras definiciones de límite CDR pueden no seguir de manera estricta uno de los enfoques anteriores, aunque no se traslaparán con al menos una porción de las CDRs de Kabat, aunque pueden ser recortadas o extendidas a
25 la luz de los hallazgos de pronóstico o experimentales de que residuos o grupos particulares de residuos o incluso CDRs completas no impactan de manera significativa el enlace de antígeno. Como se usa en la presente, una CDR puede referirse a CDRs definidas mediante cualquier enfoque conocido en la técnica,
30 que incluye combinaciones de enfoques. Los métodos utilizados en la presente pueden emplear CDRs definidas de acuerdo con cualquiera de estos enfoques. Para cualquier modalidad determinada que contenga más de una CDR, las CDRs pueden ser definidas de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat,

Chothia, extendida, AbM, de contacto, y/o conformacionales.

Como se utiliza en la presente, "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de presencia natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando restringidos contra un sitio de antígeno individual. Además, en comparación con las preparaciones de anticuerpo policlonal, las cuales incluyen comúnmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante individual en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se interpretará que requiere la producción del anticuerpo a través de cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención se pueden elaborar a través del método de hibridoma descrito primero por Kohler y Milstein, Nature 256:495, 1975, o se pueden elaborar a través de métodos de ADN recombinante tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567. Los anticuerpos monoclonales pueden también ser aislados a partir de bibliotecas de fago generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature 348:552-554, 1990, por ejemplo.

Como se utiliza en la presente, anticuerpo "humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina, o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de enlace de antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima

derivada a partir de inmunoglobulina no humana. De preferencia, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos a partir de una región de determinación de complementariedad (CDR) del receptor son remplazadas por residuos a partir de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En ciertos casos, los residuos de la región de estructura (FR) Fv de la inmunoglobulina humana son remplazados por los residuos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR importadas o de estructura, aunque están incluidas para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y comúnmente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también de manera óptima al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina o dominio (Fc), comúnmente aquella de una inmunoglobulina humana. Se prefieren los anticuerpos que tienen regiones Fc modificadas como se describió en WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDRs (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, o CDR H3) las cuales son alteradas con respecto al anticuerpo, que también son conocidas como una o más CDRs "derivadas a partir de" una o más CDRs desde el anticuerpo original.

Como se utiliza en la presente, "anticuerpo humano" representa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácido que corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano y/o que ha sido elaborado utilizando cualquiera de las

técnicas para elaborar anticuerpos humanos conocidas por aquellos con experiencia en la técnica o descritas en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden por lo menos un polipéptido de

5 cadena pesada humano o por lo menos un polipéptido de cadena ligera humano. Uno de esos ejemplos es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera de murino y de cadena pesada de humano. Los anticuerpos humanos se pueden elaborar utilizando varias técnicas

10 conocidas. En una modalidad, el anticuerpo humano es seleccionado a partir de una biblioteca de fago, en donde esa biblioteca de fago expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al., Nature Biotechnology, 14:309-314, 1996; Sheets et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:6157-6162, 1998;

15 Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381, 1991; Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581, 1991). Los anticuerpos humanos también se pueden elaborar a través de inmunización de animales dentro de los cuales han sido introducidos de manera transgénica locus de inmunoglobulina humana en

20 lugar de los locus endógenos, por ejemplo, ratones en los cuales los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Este enfoque se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y

25 5,661,016. De manera alternativa, el anticuerpo humano puede ser preparado inmortalizando linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno de objetivo (dichos linfocitos B pueden ser recuperados a partir de un individuo o a partir de clonación celular individual del

30 ADNc, o pueden haber sido inmunizados *in vitro*). Véase por ejemplo, Cole et al. Anticuerpos monoclonales and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77, 1985; Boerner et al., J. Immunol., 147 (1):86-95, 1991; y la Patente de los Estados Unidos No. 5,750,373.

El término "anticuerpo quimérico" está destinado a referirse a anticuerpos en los cuales las secuencias de región variable son derivadas a partir de una especie y las secuencias de región constante son derivadas a partir de otra especie, tal como un anticuerpo en el cual las secuencias de región variable son derivadas a partir de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante son derivadas a partir de un anticuerpo humano.

Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" son utilizados de manera intercambiable en la presente para referirse a cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, de preferencia, relativamente cortas (por ejemplo, 10-100 aminoácidos). La cadena puede ser lineal o ramificada, puede comprender aminoácidos modificados, y/o pueden ser interrumpidas por no-aminoácidos. Los términos abarcan también una cadena de aminoácido que ha sido modificada naturalmente o a través de intervención; por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. Incluidos también dentro de la definición se encuentran, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etcétera), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se comprende que los polipéptidos pueden presentarse como cadenas individuales o cadenas asociadas.

Un "anticuerpo monovalente" comprende un sitio de enlace de antígeno por molécula (por ejemplo, IgG o Fab). En ciertos casos, un anticuerpo monovalente puede tener más de un sitio de enlace de antígeno, aunque los sitios de enlace sean a partir de diferentes antígenos.

Un "anticuerpo bivalente" comprende dos sitios de enlace de antígeno por molécula (por ejemplo, IgG). En ciertos casos, los dos sitios de enlace tienen las mismas especificidades de antígeno. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos.

Un anticuerpo "biespecífico," "específico-dual" o "bifuncional"

es un anticuerpo híbrido que tiene dos diferentes sitios de enlace de antígeno. Los dos sitios de enlace de antígeno de un anticuerpo biespecífico se enlazan a dos epítopos diferentes, los cuales pueden residir en los mismos o
5 diferentes objetivos de proteína.

Los anticuerpos de la invención pueden ser producidos utilizando técnicas bien conocidas, por ejemplo, tecnologías recombinantes, tecnologías de expresión en fago, tecnologías sintéticas o combinaciones de esas tecnologías u otras
10 tecnologías fácilmente conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Jayasena, S.D., Clin. Chem., 45: 1628-50, 1999 and Fellouse, F.A., et al, J. Mol. Biol., 373(4):924-40, 2007).

Como se conoce en la técnica, "polinucleótido," o "ácido nucléico," como se utiliza de manera intercambiable en la presente, se refiere a cadenas de nucleótidos de cualquier longitud, e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser
15 desoxiribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que puede ser incorporado dentro de una cadena mediante polimerasa de ADN o ARN. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura del nucleótido puede ser impartida antes o después del ensamble de la cadena. La secuencia de
20 nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no-nucleótidos. Un polinucleótido puede ser modificado además después de la polimerización, por ejemplo mediante conjugación con un componente de marcado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "limitaciones", sustitución de uno o más de los nucleótidos presentes de
25 manera natural con un análogo, modificaciones internucleótido como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etcétera) y con enlaces con carga
30

(por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etcétera), aquellos que contienen porciones pendientes, como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal poli-L-lisina, etcétera), aquellos con intercaladores (por ejemplo, 5 acridina, psoralen, etcétera), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etcétera), aquellos que contienen alquilatadores, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etcétera), así como formas no modificadas del (los) 10 polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo ordinariamente presentes en los azúcares pueden ser remplazados, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por medio de grupos protectores estándar, o activados para preparar enlaces adicionales para nucleótidos adicionales, o pueden ser 15 conjugados para soportes sólidos. El OH 5'- y 3'-terminal puede ser fosforilado o sustituido con aminas o porciones de grupo de limitación orgánico desde 1 hasta 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden ser derivados para grupos protectores estándar. Los polinucleótidos pueden contener también formas 20 análogas de ribosa o azúcares de desoxiribosa que generalmente son conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclica, azúcares alfa- o beta-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de 25 piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósido abásico tales como metil ribosida. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden ser remplazados por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, aunque no se limitan a, modalidades en 30 donde el fosfato es remplazado por P(O)S("tioato"), P(S)S("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los cuales cada R o R' es de manera independiente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contienen opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo,

cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente aplica a todos los polinucleótidos referidos en la presente, incluyendo ARN y ADN.

5 Como se conoce en la técnica una "región constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación.

10 Como se usa en la presente, "sustancialmente puro" se refiere a un material que por lo menos es 50% puro (es decir, está libre de contaminantes), de mayor preferencia, al menos 90% puro, más preferiblemente, al menos 95% puro, de modo aún más preferible, al menos 98% puro, y de la manera más preferible, al menos 99% puro.

15 Una "célula huésped" incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de vector(es) para incorporación de insertos de polinucleótido. Las células huésped incluyen progenie de una célula huésped individual, y la progenie puede no necesariamente ser
20 idéntica por completo (en morfología o en complemento ADN genómico) a la célula padre original debido a mutación natural, accidental, o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas in vivo con un polinucleótido(s) de esta invención.

25 Como se conoce en la técnica, el término "región Fc" es usado para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La "región Fc" puede ser la región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de
30 inmunoglobulina pueden variar, la región FC de cadena pesada de IgG humana usualmente está definida para extenderse desde un residuo aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la misma. La numeración de los residuos en la región Fc es

aquella del índice EU como en Kabat. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. La región Fc de una inmunoglobulina comprende por lo general dos regiones
 5 constantes, CH2 y CH3.

Como se usa en la técnica, "receptor Fc" y "FcR" describe un receptor que se enlaza a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se enlaza a un anticuerpo IgG (un receptor
 10 gamma) e incluye los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y alternativamente formas cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias aminoácido
 15 similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. Los FcRs son revisados en Ravetch and Kinet, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92, 1991; Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34, 1994; and de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41, 1995. "FcR" incluye también al receptor neonatal, FcRn, el cual es
 20 responsable de la transferencia de IgGs materno al feto (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587, 1976; and Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249, 1994).

El término "compite", como se utiliza en la presente con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo, o un
 25 fragmento de enlace de antígeno (o porción) del mismo, se enlaza a un epítipo de una manera suficientemente similar al enlace de un segundo anticuerpo, o una porción de enlace a antígeno del mismo, de modo que el resultado del enlace del primer anticuerpo con su epítipo cognado se reduce de manera detectable en la presencia
 30 de la segunda anticuerpo comparado con el enlace del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, en donde el enlace del segundo anticuerpo a su epítipo puede también, aunque no necesariamente es el caso, reducirse de modo detectable en presencia del primer anticuerpo. Es decir, un primer

anticuerpo puede inhibir el enlace de un segundo anticuerpo a su epítotope sin que el segundo anticuerpo que inhibe el enlace del primer anticuerpo a su epítotope respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de modo detectable el enlace del otro anticuerpo con su epítotope cognado o ligando, ya sea en el mismo, mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos tienen "competencia cruzada" entre sí para el enlace de su(s) epítotope(s) respectivo(s). Ambos anticuerpos de competencia y de competencia cruzada están comprendidos por la presente invención. Sin consideración del mecanismo a través del cual ocurra dicha competencia o competencia cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio de conformación, o enlace a un epítotope común, o porción del mismo), el técnico experimentado apreciaría, en base a las enseñanzas aquí proporcionadas, que dicho anticuerpos de competencia y/o de competencia cruzada están comprendidos y pueden ser útiles para los métodos descritos en la presente.

Una "región Fc funcional" posee al menos una función efectora de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" ilustrativas incluyen enlace C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; enlace de receptor Fc; citotoxicidad célula mediada dependiente de anticuerpo; fagocitosis; sub-regulación de receptores de superficie celular (por ejemplo receptor celular B), etcétera. Dichas funciones efectoras requieren por lo general de la región Fc para ser combinada con un dominio de enlace (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se puede determinar utilizando varios ensayos conocidos en la técnica para evaluar dichas funciones efectoras de anticuerpo.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácido idéntica a la secuencia de aminoácido de una región Fc encontrada en la naturaleza. Una "región Fc variante" comprende una secuencia de

aminoácido que difiere de aquella de una región Fc de secuencia nativa en virtud de por lo menos una modificación de aminoácido, aunque retiene por lo menos una función efectora de la región Fc de secuencia nativa. En ciertas modalidades, la región Fc variante
5 tiene por lo menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o para la región Fc de un polipéptido padre, por ejemplo desde aproximadamente una hasta aproximadamente diez sustituciones de aminoácido, y de preferencia, desde aproximadamente una hasta aproximadamente
10 cinco sustituciones de aminoácido en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido padre. La región Fc variante tendrá, de manera preferible en la presente, por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido padre,
15 y de mayor preferencia, por lo menos de aproximadamente 90% de identidad de secuencia con el mismo, de mayor preferencia, por lo menos de aproximadamente 95%, por lo menos de aproximadamente 96%, por lo menos de aproximadamente 97%, por lo menos de aproximadamente 98%, por lo menos de
20 aproximadamente 99% de identidad de secuencia con el mismo.

El término "función efectora" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen, aunque no se limitan a, citotoxicidad mediada por célula dependiente de
25 anticuerpo (ADCC), enlace de receptor Fc, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), fagocitosis, enlace C1q, y subregulación de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de célula B; BCR). Véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 6,737,056. Dichas funciones efectoras
30 requieren por lo general que la región Fc sea combinada con un dominio de enlace (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se puede evaluar utilizando varios ensayos conocidos en la técnica para evaluar dichas funciones efectoras de anticuerpo. Una medición ilustrativa de la función efectora es a través de enlace

Fcy3 y/o C1q.

Como se usa en la presente "citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una reacción mediada por célula en la cual células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcRs) (por ejemplo, 5 linfocitos citolíticos espontáneos (NK), neutrófilos, y macrófagos) reconocen el anticuerpo enlazado en una célula de objetivo y subsecuentemente ocasionan la lisis de la célula de objetivo. La actividad ADCC de una molécula de 10 interés se puede determinar utilizando un ensayo ADCC *in vitro*, tal como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,500,362 o 5,821,337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) y células NK. De manera 15 alternativa, o adicional, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede determinar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo de mamífero tal como aquel descrito en Clynes et al., 1998, *PNAS (USA)*, 95:652656.

"Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se 20 refiere a la lisis de un objetivo en presencia del complemento. La vía de activación de complemento es iniciada por medio del enlace del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) en complejo con un antígeno cognado. Para 25 evaluar la activación de complemento, se puede ejecutar un ensayo CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202: 163 (1996).

Como se utiliza en la presente, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos benéficos o 30 deseados. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos benéficos o deseados incluyen, aunque no se limitan a, uno o más de los siguientes: reducir la proliferación de (o destrucción de) células neoplásicas o cancerosas, inhibir la metástasis de células neoplásicas,

contracción o reducción del tamaño del tumor que expresa Trop-2, remisión de una enfermedad asociada con Trop-2 (por ejemplo, cáncer), reducción de los síntomas que resultan a partir de una enfermedad asociada con Trop-2 (por ejemplo, cáncer), incrementar
5 la calidad de vida de aquellos que padecen una enfermedad asociada con Trop-2 (por ejemplo, cáncer), reducción de la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar una enfermedad asociada con Trop-2 (por ejemplo, cáncer), retrasar la progresión de una enfermedad asociada con Trop-2 (por ejemplo, cáncer),
10 curar una enfermedad asociada con Trop-2 (por ejemplo, cáncer), y/o prolongar la sobrevivencia de pacientes que tienen una enfermedad asociada con Trop-2 (por ejemplo, cáncer).

"Mejorar" representa una reducción o mejoría de uno o más síntomas en comparación con la falta de administración de un
15 anticuerpo Trop-2 o un conjugado de anticuerpo Trop-2. "Mejorar" incluye también el acortamiento o reducción de la duración de un síntoma.

Como se utiliza en la presente, una "dosificación efectiva" o "cantidad efectiva" de fármaco, compuesto, o composición
20 farmacéutica es una cantidad suficiente para obtener uno o más de los resultados clínicos benéficos o deseados. Para uso profiláctico, los resultados benéficos o deseados incluyen la eliminación o reducción del riesgo, reducción de la severidad, o retraso del inicio de la enfermedad, que incluyen síntomas bioquímicos, histológicos
25 y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados benéficos o deseados incluyen los resultados clínicos tales como la reducción de la incidencia o mejoría de uno o más síntomas de varias
30 enfermedades o condiciones asociadas con Trop-2 (tales como cánceres gástrico, de cabeza y cuello, pulmonar, de ovarios y pancreático), reducción de la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, mejorar el efecto de otro medicamento, y/o retrasar la progresión de la enfermedad asociada

con Trop-2 de los pacientes. Una dosificación efectiva puede ser suministrada en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una dosificación efectiva de fármaco, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad
5 suficiente para realizar el tratamiento profiláctico y/o terapéutico ya sea de manera directa o indirecta. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación efectiva de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no lograrse en conjunción con otro fármaco, compuesto, o
10 composición farmacéutica. Por tanto, una "dosificación efectiva" puede ser considerada en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar un agente individual para ser suministrado en una cantidad efectiva si, es en conjunción con uno o más agentes distintos,
15 se puede o no lograr un resultado deseable.

Un "individuo" o un "sujeto" es un mamífero, de mayor preferencia un ser humano. Los mamíferos incluyen también, aunque no se limitan a, animales de granja, animales para deportes, mascotas, primates, caballos, perros, gatos,
20 ratones y ratas.

Como se utiliza en la presente, "vector" representa un constructo, el cual es capaz de suministrar, de preferencia, expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, aunque
25 no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores de plásmido, cósmido o fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células
30 eucarióticas, tales como células productoras.

Como se utiliza en la presente, "secuencia de control de expresión" representa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de expresión puede ser un promotor, tal como un

promotor constitutivo o inducible, o un mejorador. La secuencia de control de expresión está operablemente enlazada a la secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir.

Como se utiliza en la presente, "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéutico aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo, permite que el ingrediente retenga la actividad biológica y no es reactivo con el sistema inmune del sujeto. Los ejemplos incluyen, aunque no se limitan a, cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar tales como solución salina regulada en su pH con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión aceite/agua, y varios tipos de agentes de humectación. Los diluyentes preferidos para administración en aerosol o parenteral son solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS) o solución salina normal (0.9%). Las composiciones que comprenden dichos vehículos son formuladas a través de métodos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; and Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005).

El término "marcador que contiene glutamina donador de acilo" o "marcador de glutamina" como se usa en la presente se refiere a un polipéptido o una proteína que contiene uno o más residuos Gln que actúan como un aceptor de transglutaminasa amina. Véase, por ejemplo, WO2012059882.

El término " k_{on} ", como se utiliza en la presente, se refiere a una constante de velocidad para asociación de un anticuerpo a un antígeno. De manera específica, las constantes de velocidad (k_{on} y k_{off}) y las constantes de disociación de equilibrio se midieron utilizando fragmentos de anticuerpo Fab (es decir, monovalentes) y proteínas Trop-2 (por ejemplo, proteína de fusión Trop-2-Fc).

El término " k_{off} ", como se utiliza en la presente, se refiere a la constante de velocidad para disociación de un anticuerpo a partir de un complejo anticuerpo/antígeno.

El término " K_D ", como se utiliza en la presente, se refiere a la constante de disociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno.

5 La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) modalidades que están dirigidas a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X." los rangos numéricos son inclusivos de los números que definen el rango.

10 Se comprende que se proporcionan también cualesquiera de las modalidades que se describe en la presente con la redacción "que comprende", modalidades de otra forma análogas descritas en términos de "consiste en" y/o "que consta esencialmente de".

15 Cuando los aspectos o modalidades de la invención se describen en términos de un grupo Markush u otro agrupamiento de alternativas, la presente invención comprende no solo el grupo completo listado como un todo, sino cada miembro del grupo de manera individual y todos los
20 posibles subgrupos del grupo principal, aunque también el grupo principal que carece de uno o más de los miembros del grupo. La presente invención contempla también la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros de grupo en la invención reclamada.

25 A menos de que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado comúnmente conocido por alguien con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece la invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente
30 especificación, que incluye definiciones. A través de esta especificación y reivindicaciones, se entenderá que la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" implican la inclusión de un entero establecido o grupo de enteros aunque no la exclusión de cualquier otro

entero o grupo de enteros. A menos de que el contexto lo requiera de otro modo, los términos singulares incluirán las pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

Los métodos y materiales ilustrativos se describen en la presente, aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí también pueden ser utilizados en la práctica o prueba de la presente invención. Los materiales, métodos, y ejemplos son tan sólo ilustrativos y no están destinados a ser limitantes.

10

Anticuerpos Trop-2 y Métodos para la Elaboración de los Mismos

La presente invención proporciona un anticuerpo que se enlaza a Trop-2. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, que se enlaza de manera específica a un dominio 3 (por ejemplo, residuos de aminoácido 153-206) y dominio 4 (por ejemplo, residuos de aminoácido 209-273) de Trop-2 humano (por ejemplo, NO ID SEC: 27) con una afinidad e enlace de anticuerpo monovalente (K_D) de 6.5 nM o menos como se midió a través de resonancia plasmónica de superficie. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, que se enlaza de manera específica un dominio 1 (por ejemplo, residuos de aminoácido 27-70) de Trop-2 humano (por ejemplo, NO ID SEC: 27) con una afinidad de enlace (K_D) de aproximadamente 35 nM o menos como se midió a través de resonancia plasmónica de superficie.

Los anticuerpos y conjugados de anticuerpo de la invención están caracterizados por una o más de las siguientes características: (a) se enlazan a Trop-2; (b) reducen o sub-regulan la expresión de proteína de Trop-2; (c) tratan, previenen, mejoran uno o más de los síntomas de una condición asociada con la expresión de Trop-2 en un sujeto (por ejemplo, cáncer, tal como cáncer gástrico, de cabeza y cuello, pulmonar, de ovarios o

pancreático); (d) inhiben el crecimiento o progresión de tumor en un sujeto (quien tiene un tumor que expresa Trop-2); (e) inhiben la metástasis de células cancerosas que expresan Trop-2 en un sujeto (quien tiene una o más células cancerosas que expresan Trop-2); (f) inducen la regresión (por ejemplo, la regresión a largo plazo) de un tumor que expresa Trop-2; (g) ejercer actividad citotóxica en células que expresan Trop-2; (h) desactivan o sub-regulan la vía ERK1/2 MAPK; y (i) bloquean la interacción Trop-2 con otros factores aún por identificar.

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden comprender anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etcétera), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos de heteroconjugado, cadena simple (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo (por ejemplo, un dominio de anticuerpo), anticuerpos humanizados, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, que incluyen variantes glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácido de anticuerpos, y anticuerpos modificados de manera covalente. Los anticuerpos pueden ser de murino, rata, humanos, o de cualquier otro origen (que incluyen anticuerpos quiméricos o humanizados).

En ciertas modalidades, el anticuerpo Trop-2 como se describe en la presente es un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, el anticuerpo Trop-2 es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal quimérico.

En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante modificada, como, por ejemplo sin limitación, una región constante que tiene un potencial incrementado para provocar una respuesta inmune. Por

ejemplo, la región constante puede ser modificada para tener una afinidad incrementada para un receptor gamma Fc tal como, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIA, o FcγRIII.

En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, es decir, que tiene un potencial reducido para provocar una respuesta inmune. En ciertas modalidades, la región constante es modificada como se describe en Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999; Solicitud PCT No. PCT/GB99/01441; y/o Solicitud de Patente del RU No. 98099518. El Fc puede ser IgG1 humano, IgG2 humano, IgG3 humano, o IgG4 humano. El Fc puede ser IgG2 humano que contiene la mutación A330P331 para S330S331 (IgG2Δa), en la cual los residuos de aminoácido son numerados con referencia a la secuencia IgG2 nativa. Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de IgG₄ que comprende las siguientes mutaciones (Armour et al., Molecular Immunology 40 585-593, 2003): E233F234L235 para P233V234A235 (IgG4Δc), en la cual la numeración es con referencia a IgG4 nativo. En otra modalidad más, el Fc es IgG4 humano E233F234L235 para P233V234A235 con eliminación G236 (IgG4Δb). En otra modalidad el Fc es cualquier IgG4 Fc humano (IgG4, IgG4Δb o IgG4Δc) que contiene mutación de estabilización de bisagra S228 para P228 (Aalberse et al., Immunology 105, 9-19, 2002). En otra modalidad, el Fc puede ser Fc aglicosilado.

En ciertas modalidades, la región constante es aglicosilada mediante mutación del residuo de fijación de oligosacárido (tal como Asn297) y/o residuos flanqueadores que son parte de la secuencia de reconocimiento de glicosilación en la región constante. En ciertas modalidades, la región constante es aglicosilada para glicosilación N-enlazada enzimáticamente. La región constante puede ser aglicosilada para glicosilación N-enlazada enzimáticamente o mediante expresión en una célula huésped deficiente de glicosilación.

Una forma de determinar la afinidad de enlace de anticuerpos a Trop-2 es midiendo la afinidad de enlace de fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) puede ser separado con papaína o expresado de manera recombinante. La afinidad de un fragmento Trop-2 Fab de un anticuerpo se puede determinar mediante resonancia plasmónica de superficie (BiacoreTm3000^{rm} sistema de resonancia plasmónica de superficie (SPR), BiacoreTM, INC, Piscataway NJ) equipada con microcircuitos de sensor de estreptavidina pre-inmovilizados (SA) o Fc anti-ratón o Fc anti-humano utilizando solución reguladora de corrida HBS-EP (0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20). Trop-2 humano biotinilado o de fusión Fc puede ser diluido en solución reguladora de corrida HBS-EP a una concentración menor a 0.5 µg/mL e inyectado a través de los canales de circuito individuales usando tiempos de contacto variables, para lograr dos rangos de densidad de antígeno, ya sea 50-200 unidades de respuesta (RU) para estudios cinéticos detallados u 800-1,000 RU para ensayos de tamizado. Los estudios de regeneración han demostrado que 25 mM NaOH en 25% v/v etanol remueve de manera efectiva el Fab enlazado en tanto que mantiene la actividad de Trop-2 en el microcircuito durante más de 200 inyecciones. De manera común, las diluciones seriales (que abarcan concentraciones de 0.1-10x K_D calculada) de muestras Fab purificadas son inyectadas durante 1 minuto a 100 µL/minuto y se permitieron tiempos de disociación de hasta 2 horas. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinaron mediante ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE utilizando una Fab de concentración conocida (como se determinó mediante análisis de aminoácido) como un estándar. Las velocidades de asociación cinética (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se obtienen de manera simultánea mediante el ajuste de los

datos globalmente para un modelo de enlace de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110) utilizando el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de disociación de equilibrio (K_D) fueron calculados como k_{off}/k_{on} . Este protocolo es adecuado para uso en la determinación de afinidad de enlace de un anticuerpo a cualquier Trop-2, incluyendo Trop-2 humano, Trop-2 de otro mamífero (tal como Trop-2 de ratón, Trop-2 de rata, o Trop-2 de primate), así como diferentes formas de Trop-2 (por ejemplo, Trop-2 glicosilado). La afinidad de enlace de un anticuerpo se mide generalmente a 25°C, aunque también se puede medir a 37°C.

Los anticuerpos Trop-2 como se describen en la presente se pueden elaborar a través de cualquier método conocido en la técnica. Para la producción de líneas celulares de hibridoma, la ruta y programa de inmunización del animal huésped generalmente son de conformidad con las técnicas establecidas y convencionales para la estimulación y producción de anticuerpo, como se describirá adicionalmente en la presente. Las técnicas generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón son conocidas en la técnica y/o se describen en la presente.

Se considera que cualquier sujeto mamífero que incluye seres humanos o células productoras de anticuerpo a partir de los mismos puede ser manipulado para servir como la base para la producción de mamíferos, que incluyen líneas celulares humanas y de hibridoma. De manera común, el animal huésped es inoculado por vía intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutánea, intraplantar, y/o intradérmica con una cantidad de inmunógeno, que incluye como se describe en la presente.

Los hibridomas se pueden preparar a partir de linfocitos y células de mieloma inmortalizadas utilizando la técnica de hibridación celular somática de Kohler, B. and Milstein, C., Nature 256:495-497, 1975 o como se modificó mediante Buck, D. W., et al., In Vitro, 18:377-381, 1982. Las líneas de mieloma disponibles, que incluyen aunque no se limitan a X63-Ag8.653 y aquellas a

partir del Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA, pueden ser utilizadas en la hibridación. Por lo general, las técnicas involucran fusión de células de mieloma y células linfóides utilizando un fusógeno tal como polietilen glicol, o a través de medios eléctricos bien conocidos por
5 alguien con experiencia en la técnica. Después de la fusión, las células son separadas desde el medio de fusión y son cultivadas en un medio de crecimiento selectivo, tal como el medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), para
10 eliminar las células padre no hibridadas. Cualquiera de los medios aquí descritos, complementado con o sin suero, puede ser utilizado para cultivar los hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, se pueden utilizar células B inmortalizadas
15 EBV a fin de producir los anticuerpos monoclonales Trop-2 de la presente invención. Los hibridomas son expandidos y subclonados, si se desea, y los sobrenadantes son probados para la actividad anti-inmunógeno a través de procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo,
20 radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático, o inmunoensayo de fluorescencia).

Los hibridomas que se pueden utilizar como la fuente de anticuerpos comprenden todos los derivados, células de progenie de los hibridomas padre que producen anticuerpos
25 monoclonales específicos para Trop-2, o una porción de los mismos.

Los hibridomas que producen dichos anticuerpos pueden ser cultivados *in vitro* o *in vivo* usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales pueden ser aislados
30 a partir del medio de cultivo o fluidos corporales, a través de procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como precipitación de sulfato de amonio, electroforesis de gel, diálisis, cromatografía, y ultrafiltración, si se desea. La actividad indeseable, si está

presente, puede ser eliminada, por ejemplo, al operar la preparación sobre adsorbentes elaborados a partir del inmunógeno fijado a una fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados fuera del inmunógeno. La inmunización de un animal huésped con un Trop-2 humano, o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácido de objetivo conjugada para una proteína que es inmunogénica en las especies que van a ser inmunizadas, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soya utilizando un agente bifuncional o de derivación, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en donde R y R^1 son diferentes grupos alquilo, pueden producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

Si se desea, el anticuerpo Trop-2 (monoclonal o policlonal) de interés puede ser secuenciado y la secuencia de polinucleótido puede ser clonada después en un vector para expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés se puede mantener en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede ser expandida después y congelada para uso futuro. La producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en cultivo celular se puede llevar a cabo a través de clonación de genes de anticuerpo a partir de células B con el uso de medios conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Tiller et al., J. Immunol. Methods 329, 112, 2008; Patente de los Estados Unidos No. 7,314,622.

En una alternativa, la secuencia de polinucleótido puede ser usada para la manipulación genética a fin de "humanizar" el anticuerpo o para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante puede ser modificada genéticamente para asemejarse más estrechamente a las regiones constantes para evitar la respuesta inmune si el anticuerpo es

utilizado en pruebas clínicas y tratamientos en seres humanos. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia de anticuerpo para obtener mayor afinidad para Trop-2 y mayor eficacia en la inhibición de Trop-2.

5 Existen cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar el nucleótido y la secuencia de aminoácido pronosticada de los dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo de partida (2) designar el anticuerpo humanizado, es decir.,
10 decidir que región de estructura de anticuerpo utilizar durante el proceso de humanización (3) las metodologías/técnicas de humanización reales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692;
15 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; y 6,180,370.

 Se ha descrito un número de moléculas de anticuerpo "humanizado" que comprenden un sitio de enlace de antígeno derivado a partir de una inmunoglobulina no humana, que
20 incluyen anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor o de roedor modificado y sus CDRs asociadas fusionadas a las regiones constantes humanas. Véase, por ejemplo, Winter et al. *Nature* 349:293-299, 1991, Lobuglio et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224, 1989, Shaw et al.
25 *J Immunol.* 138:4534-4538, 1987, and Brown et al. *Cancer Res.* 47:3577-3583, 1987. Otras referencias describen CDRs de roedor injertadas en una región de estructura (FR) de soporte humana antes de la fusión con una región constante de anticuerpo humano adecuada. Véase, por ejemplo,
30 Riechmann et al. *Nature* 332:323-327, 1988, Verhoeyen et al. *Science* 239:1534-1536, 1988, and Jones et al. *Nature* 321:522-525, 1986. Otra referencia describe CDRs de roedor soportadas por regiones de estructura de roedor modificadas de manera recombinante. Véase, por ejemplo, la Publicación

de Patente Europea No. 0519596. Estas moléculas "humanizadas" están diseñadas para reducir al mínimo la respuesta inmunológica indeseable hacia moléculas de anticuerpo anti-humano de roedor lo cual limita la duración y efectividad de las aplicaciones terapéuticas de estas porciones en receptores humanos. Por ejemplo, la región constante de anticuerpo puede ser modificada genéticamente de modo que es inmunológicamente inerte (por ejemplo, no activa la lisis de complemento). Véase, por ejemplo, la Publicación PCT No. PCT/GB99/01441; Solicitud de Patente de RU No. 9809951.8. Otros métodos de humanización de anticuerpos que también se pueden utilizar están descritos por Daugherty et al., Nucl. Acids Res. 19:2471-2476, 1991, and in Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; 5,866,692; 6,210,671; and 6,350,861; y en la Publicación PCT No. WO 01/27160.

Los principios generales relacionados con anticuerpos humanizados descritos con anterioridad también son aplicables para adaptar anticuerpos para uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Además, uno o más aspectos de la humanización de un anticuerpo descritos en la presente se pueden combinar, por ejemplo, injerto de CDR, mutación de estructura y mutación CDR.

En una variación, los anticuerpos completamente humanos se pueden obtener por medio del uso de ratones comercialmente disponibles que han sido modificados para expresar proteínas de inmunoglobulina humana específicas. Los animales transgénicos que son diseñados para producir una respuesta inmune más deseable (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos) o más robusta también pueden ser utilizados para la generación de anticuerpos humanos o humanizados. Ejemplos de dicha tecnología son Xenomouse TM de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC MouseTM de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

En una alternativa, los anticuerpos se pueden elaborar de manera recombinante y ser expresados utilizando cualquier método

conocido en la técnica. En otra alternativa, los anticuerpos se pueden hacer de modo recombinante mediante tecnología de exposición en fago. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; and 6,265,150; y Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455, 1994. De modo alternativo, la tecnología de exhibición en fago (McCafferty et al., Nature 348:552-553, 1990) puede ser utilizada para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios de gen de dominio variable (V) de inmunoglobulina a partir de donadores no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpo son clonados dentro del marco en cualquiera de un gen de proteína de cabra mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y exhibidos como fragmentos de anticuerpo funcional en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia ADN monocatenario del genoma de fago, las selecciones en base a las propiedades funcionales del anticuerpo también resultan en la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Por tanto, el fago simula algunas de las propiedades de la célula B. La exhibición en fago se puede realizar en una variedad de formatos; para revisión véase por ejemplo, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571, 1993. Se pueden emplear varias fuentes de segmentos de gen-V para la exhibición en fago. Clackson et al., Nature 352:624-628, 1991, aislados a partir de una variada disposición de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca de combinación aleatoria de genes V derivada a partir de los bazo de ratones inmunizados. Se puede elaborar un repertorio de genes V a partir de donadores humanos no inmunizados y los anticuerpos para una variada disposición de antígenos (que incluyen antígenos propios) pueden ser aislados de manera esencial siguiendo

las técnicas descritas por Mark et al., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991, o Griffith et al., EMBO J. 12:725-734, 1993. En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpo acumulan mutaciones a una alta velocidad (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán mayor afinidad, y las células B que exhiben una inmunoglobulina de superficie de alta afinidad preferencialmente son replicadas y diferenciadas durante el desafío antigénico subsecuente. Este proceso natural puede ser imitado al emplear la técnica conocida como "transposición de cadena". (Marks et al., Bio/Technol. 10:779-783, 1992). En este método, la afinidad de los anticuerpos humanos "primarios" obtenidos mediante la exhibición en fago se puede mejorar a través de la reubicación secuencial de los genes de región V de cadena pesada y ligera con los repertorios de variantes de presencia natural (repertorios) de genes de dominio V obtenidos a partir de los donadores no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades en el rango pM-nM. Una estrategia para elaborar repertorios de anticuerpo de fago muy grandes (conocidos también como "la madre de todas las bibliotecas") ha sido descrita por Waterhouse et al., Nucl. Acids Res. 21:2265-2266, 1993. La transposición de gen también puede ser utilizada para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedor, en donde el anticuerpo humano tiene afinidades similares y especificidades para el anticuerpo de roedor de partida. De acuerdo con este método, el cual también es referido como "impronta de epítope", el gen de dominio V de cadena ligera y pesada de anticuerpos de roedor obtenido mediante la técnica de exhibición en fago es remplazado con repertorio de genes de dominio V humanos, creando quimeras roedor-humano. La selección sobre los resultados de antígeno en el aislamiento de regiones variables humanas capaces de restaurar un sitio de enlace de antígeno funcional, es decir, el epítope regula (marca) la selección de asociado. Cuando se repite el proceso para remplazar el dominio V de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano

(véase la Publicación PCT No. WO 93/06213). A diferencia de la humanización común de los anticuerpos de roedor mediante injerto CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, los cuales no tienen estructura ni
5 residuos CDR de origen de roedor.

Los anticuerpos se pueden hacer de manera recombinante al aislar primero los anticuerpos y células productoras de anticuerpo desde los animales huéspedes, obteniendo la secuencia de gen, y utilizando la secuencia de
10 gen para expresar el anticuerpo de modo recombinante en las células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro método que se puede emplear es expresar la secuencia de anticuerpo en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han descrito métodos para expresar los anticuerpos de manera
15 recombinante en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters, et al. Vaccine 19:2756, 2001; Lonberg, N. and D. Huszar Int. Rev. Immunol 13:65, 1995; y Pollock, et al., J Immunol Methods 231:147, 1999. Se conocen en la técnica métodos para elaborar derivados de anticuerpos, por ejemplo
20 humanizados, de cadena simple, etcétera.

Los inmunoensayos y las técnicas de clasificación de citometría de flujo tales como clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) también se pueden emplear para
aislar anticuerpos que son específicos para Trop-2.

25 Los anticuerpos como se describen en la presente pueden enlazarse a muchos vehículos distintos. Los vehículos pueden ser activos y/o inertes. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, vidrio, celulosas
30 naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas, y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Aquellos con experiencia en la técnica conocerán otros vehículos apropiados para enlazar anticuerpos, o serán capaces de

determinarlos, utilizando experimentación de rutina. En ciertas modalidades, el vehículo comprende una porción que se dirige al miocardio.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales es aislado
5 fácilmente y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótido que son capaces de enlazarse de manera específica a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente
10 preferida de dicho ADN. Una vez obtenido, el ADN puede ser colocado en vectores de expresión (tales como los vectores de expresión descritos en la Publicación PCT No. WO 87/04462), los cuales son transfectados después en las células huéspedes tales como las células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro
15 modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huéspedes recombinantes. Véase por ejemplo, Publicación PCT No. WO 87/04462. El ADN también puede ser modificado, por ejemplo,
20 mediante sustitución de la secuencia de codificación para regiones constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencia de murino homólogas, Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, 1984, o mediante unión covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia de
25 codificación para un polipéptido de no-inmunoglobulina. De esa manera, se preparan los anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de enlace de un anticuerpo monoclonal Trop-2 en la presente.

Los anticuerpos Trop-2 como se describen en la presente
30 pueden ser identificados o caracterizados utilizando métodos conocidos en la técnica, por lo que la reducción de los niveles de expresión de Trop-2 es detectada y/o medida. En ciertas modalidades, un anticuerpo Trop-2 es identificado mediante la incubación de un agente candidato con Trop-2 y monitoreo de

enlace y/o reducción acompañante de los niveles de expresión de Trop-2. El ensayo de enlace se puede efectuar con polipéptido(s) Trop-2 purificado(s), o con células que expresan de manera natural, o transfectadas para expresar, polipéptido(s) Trop-2. En una modalidad, el ensayo de enlace es un ensayo de enlace competitivo, en donde se evalúa la habilidad de un anticuerpo candidato para competir con un anticuerpo Trop-2 conocido para enlace Trop-2. El ensayo se puede realizar en varios formatos, incluyendo el formato ELISA.

Después de la identificación inicial, la actividad de un anticuerpo Trop-2 candidato puede ser confirmada de manera adicional y refinada por medio de bioensayos, conocidos para probar las actividades biológicas de objetivo. De manera alternativa, los bioensayos pueden ser utilizados para tamizar los candidatos directamente. Algunos de los métodos para identificar y caracterizar anticuerpos Trop-2 se describen en detalle en los Ejemplos.

Los anticuerpos Trop-2 pueden ser caracterizados utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método es identificar el epítipo al cual se enlaza, o "mapeo de epítipo". Existen muchos métodos conocidos en la técnica para mapeo y caracterización de la ubicación de epítopes en proteínas, que incluyen resolver la estructura de cristal de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmento de gen, y ensayos en base a péptido sintético, como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 11 de Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. En un ejemplo adicional, el mapeo de epítipo puede ser utilizado para determinar la secuencia a la cual se enlaza un anticuerpo Trop-2. El mapeo de epítipo está comercialmente disponible a partir de varias fuentes, por ejemplo, Pepscan

Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, The Netherlands). El epítope puede ser un epítope lineal, es decir, contenido en una extensión individual de aminoácidos, o un epítope de conformación formado mediante interacción tridimensional de aminoácidos que pueden no necesariamente estar contenidos en una extensión individual. Los péptidos de longitudes variables (por ejemplo, al menos de 4-6 aminoácidos de longitud) pueden ser aislados o sintetizados (por ejemplo, de manera recombinante) y usados para ensayos de enlace con un anticuerpo Trop-2. En otro ejemplo, el epítope al cual se enlaza el anticuerpo Trop-2 puede ser determinado en un tamizado sistemático a través del uso de péptidos traslapados derivados a partir de la secuencia Trop-2 y determinando el enlace mediante el anticuerpo Trop-2. De acuerdo con los ensayos de expresión de fragmento de gen, el marco de lectura abierto que codifica Trop-2 es fragmentado ya sea de manera aleatoria o por medio de construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los fragmentos expresados de Trop-2 con el anticuerpo que se va a probar. Los fragmentos de gen pueden, por ejemplo, ser producidos a través de PCR y después transcritos y trasladados dentro de la proteína *in vitro*, en presencia de aminoácidos radioactivos. El enlace del anticuerpo a los fragmentos Trop-2 radioactivamente marcados se determina después mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel. Ciertos epítopes pueden ser identificados también a través del uso de grandes bibliotecas de secuencias de péptido aleatorio exhibidos en la superficie de partículas de fago (bibliotecas de fago). De manera alternativa, una biblioteca definida de fragmentos de péptido traslapados puede ser probada para enlace al anticuerpo de prueba en ensayos de enlace simple. En un ejemplo adicional, la mutagénesis de un dominio de enlace de antígeno, se pueden efectuar experimentos de intercambio de dominio y de mutagénesis con tamizado de alanina para identificar los residuos requeridos, suficientes, y/o necesarios para el enlace de epítope. Por ejemplo, los experimentos de intercambio de dominio se

pueden realizar utilizando un Trop-2 mutante en el cual se han remplazado (intercambiado) varios fragmentos de la proteína Trop-2 con secuencias a partir de Trop-2 de otras especies (por ejemplo, ratón), o una proteína estrechamente relacionada, aunque antigénicamente distinta (por ejemplo, Trop-1). Mediante la determinación del enlace del anticuerpo al Trop-2 mutante, se puede evaluar la importancia del fragmento Trop-2 particular para enlace de anticuerpo.

Otro método más que se puede emplear para caracterizar un anticuerpo Trop-2 es usar ensayos de competición con otros anticuerpos conocidos para enlazarse al mismo antígeno, es decir, varios fragmentos en Trop-2, para determinar si el anticuerpo Trop-2 se enlaza al mismo epítotope que los demás anticuerpos. Los ensayos de competición son bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica.

Se puede utilizar un vector de expresión para dirigir la expresión de un anticuerpo Trop-2. Alguien con experiencia en la técnica está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véanse por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,436,908; 6,413,942; y 6,376,471. La administración de vectores de expresión incluye administración local o sistémica, que incluye inyección, administración oral, administración con pistola genética o por catéter, y administración tópica. En otra modalidad, el vector de expresión es administrado directamente al tronco simpático o ganglio, o dentro de una arteria coronaria, aurícula, ventrículo, o pericardio.

También se puede utilizar el suministro dirigido de composiciones terapéuticas que contienen un vector de expresión, o polinucleótidos subgenómicos. Las técnicas de suministro de ADN receptor-mediadas se describen, por ejemplo, en Findeis et al., Trends Biotechnol., 1993, 11:202;

Chiou et al., *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer*, J.A. Wolff, ed., 1994; Wu et al., *J. Biol. Chem.*, 263:621, 1988; Wu et al., *J. Biol. Chem.*, 269:542, 1994; Zenke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3655, 1990; and Wu et al., *J. Biol. Chem.*, 266:338, 1991. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido son administradas en un rango de aproximadamente 100 ng hasta aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia de gen. Los rangos de concentración de aproximadamente 500 ng hasta aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 µg hasta aproximadamente 500 µg, y de aproximadamente 20 µg hasta aproximadamente 100 µg de ADN se pueden utilizar también durante un protocolo de terapia de gen. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos pueden ser suministrados empleando vehículos de suministro de gen. El vehículo de suministro de gen puede ser de un origen viral o no-viral (véase en general, Jolly, *Cancer Gene Therapy*, 1:51, 1994; Kimura, *Human Gene Therapy*, 5:845, 1994; Connelly, *Human Gene Therapy*, 1995, 1:185; and Kaplitt, *Nature Genetics*, 6:148, 1994). La expresión de dichas secuencias de codificación puede ser inducida empleando mamíferos endógenos o promotores heterólogos. La expresión de la secuencia de codificación puede ser constitutiva o regulada.

Los vectores de base viral para suministro de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada son bien conocidos en la técnica. Los vehículos de base viral ilustrativos incluyen, aunque no se limitan a, retrovirus recombinantes (véanse por ejemplo, Publicaciones PCT Nos. WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 219,740 y 4,777,127; Patente de GB No. 2,200,651; y Patente EP No. 0 345 242), vectores en base a alfavirus (por ejemplo, vectores de virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus Ross River (ATCC VR-373; ATCC VR-

1246) y virus de encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), y vectores de virus adeno-asociado (AAV) (véanse por ejemplo, Publicaciones PCT Nos. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). Se puede emplear también la administración de ADN vinculada al adenovirus inactivado como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147.

Se pueden emplear también vehículos y métodos de suministro no virales, que incluyen, aunque no se limitan a, ADN condensado policationico enlazado o no enlazado al adenovirus inactivado solo (véase por ejemplo, Curiel, Hum. Gene Ther., 3:147, 1992); ADN ligando-enlazado (véase por ejemplo, Wu, J. Biol. Chem., 264:16985, 1989); células vehículos de suministro de célula eucariótica (véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,814,482; Publicaciones PCT Nos. WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización o fusión de carga nucléica con membranas celulares. También se puede emplear ADN desnudo. Los métodos de introducción de ADN desnudo ilustrativos se describen en la Publicación PCT No. WO 90/11092 y la Patente de los Estados Unidos No. 5,580,859. Los liposomas que pueden actuar como vehículos de suministro de gen se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5,422,120; Publicaciones PCT Nos. WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y EP 0524968. Los enfoques adicionales se describen en Philip, Mol. Cell Biol., 14:2411, 1994 y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci., 91:1581, 1994.

En ciertas modalidades, la invención comprende composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden los anticuerpos descritos en la presente o elaborados a través de los métodos y que tienen las características aquí descritas. Como se utiliza en la presente,

composiciones comprende uno o más anticuerpos que se enlazan a Trop-2, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más de estos anticuerpos. Estas composiciones pueden comprender además excipientes apropiados, tales como
 5 excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen soluciones reguladores de pH, las cuales son bien conocidas en la técnica.

En consecuencia, la invención proporciona cualquiera de las siguientes, o composiciones (que incluyen composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de las siguientes: (a) un
 10 anticuerpo que tiene una secuencia de cadena ligera parcial de

a)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWWYQQKPGQPPK
 LLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSRELP
 YTFGGGTKLEIK (NO ID SEC: 1),

15 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWWYQQKPGQPP
 KLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSREL
 PYTFGQGTKLEIK (NO ID SEC: 3),

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSLYSYMHWWYQQKPGQPPK
 LLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELP
 20 YTFGQGTKLEIK (NO ID SEC: 6),

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSNYSYMHWWYQQKPGQPP
 KLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSREL
 PYTFGQGTKLEIK (NO ID SEC 7),

DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQTIGTSIHWYQQRTNGSPRLLIKY
 25 ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNSWPFTFG
 SGTKLEIK (NO ID SEC: 8),

GVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTIGTSIHWYQQKPGQAPR
 LLIYYASESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQSNSWP
 FTFGQGTKLEIK (NO ID SEC: 10), o

30 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTIGTSIHWYQQKPGQAPRLLIYY
 ASESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCSQSFSWPFTFGQ
 GTKLEIK (NO ID SEC: 12)

y/o (b) un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena pesada parcial de

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWL
GVIWTGGSTDYNSALMSRLSINKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCA
RDGDYDRYTMDYWGGGTSVTVSS (NO ID SEC: 2),
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYGVHWIRQPPGKGLEWI
5 GVIWTGGSTDYNSALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
DGDYDRYTMDYWGGGTLVTVSS (NO ID SEC: 4),
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYGVHWIRQPPGKGLEWI
GVIWTSGVTDYNSALMGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
DGDYDRYTMDYWGGGTLVTVSS (NO ID SEC: 5),
10 QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPGHGLEWI
GNIYPSDSYSNYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQVSSPTSSEDSAVYYCT
YGSSFDYWGGGTTVTVSS (NO ID SEC: 9),
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLEW
MGNIYPSDSYSNYNQKFKDRVMTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYY
15 CARGSSFDYVVGQGTLVTVSS (NO ID SEC: 11), o
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVVINWVRQAPGQGLE
WMGNIFPSDSYSNYNKKFKDRVMTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVY
YCARGSGFDYVVGQGTLVTVSS(NO ID SEC: 13).

20

25

30

Cuadro 1

mAb	Cadena Ligera	Cadena Pesada
m7E6	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC <u>RAS</u> <u>KSVSTSGYSYMH</u> WYQQKPGQPPKL LIY <u>LASNLES</u> GVPARFSGSGSGTDF TLNIHPVEEEDAATYYC <u>QHSRELPY</u> <u>IF</u> GGG <u>TKLEIK</u> (NO ID SEC: 1)	QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTV <u>SG</u> <u>FSLTSYGVH</u> WVRQPPGKGLEWLG <u>VI</u> <u>WTGGST</u> DYNSAL <u>MSR</u> LSINKDNSKS QVFLKMNSLQTD <u>DTAMYYCARD</u> <u>DGDY</u> <u>DRYTMDY</u> WGQGS <u>SVTVSS</u> (NO ID SEC: 2)
h7E6	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN <u>CRA</u> <u>SKSVSTSGYSYMH</u> WYQQKPGQPP KLLIY <u>LASNLES</u> GV <u>PDRFSGSGSGT</u> DFTLTIS <u>SLQAEDVAVYYC</u> <u>QHSREL</u> <u>PYT</u> FGQ <u>GTKLEIK</u> (NO ID SEC: 3)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV <u>SG</u> <u>GSISYGVH</u> WIRQPPGKGLEWIG <u>VIW</u> <u>TGGST</u> DYNSAL <u>MSR</u> VTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYY <u>CARD</u> <u>DGDYDRY</u> <u>TMDY</u> WGQGT <u>LVTVSS</u> (NO ID SEC: 4)
h7E6_S VG	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN <u>CRA</u> <u>SKSVSTSGYSYMH</u> WYQQKPGQPP KLLIY <u>LASNLES</u> GV <u>PDRFSGSGSGT</u> DFTLTIS <u>SLQAEDVAVYYC</u> <u>QHSREL</u> <u>PYT</u> FGQ <u>GTKLEIK</u>	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV <u>SG</u> <u>GSISYGVH</u> WIRQPPGKGLEWIG <u>VIW</u> <u>TSGVTD</u> YNSAL <u>MGR</u> VTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYY <u>CARD</u> <u>DGDYDRY</u> <u>TMDY</u> WGQGT <u>LVTVS</u>

mAb	Cadena Ligera	Cadena Pesada
	(NO ID SEC: 3)	S (NO ID SEC: 5)
h7E6_S VG1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA <u>SKSVSTSGYSYMH</u> WYQQKPGQPP KLLIY <u>LASNLES</u> GVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYC <u>QHSREL</u> <u>PYT</u> FGQGTKLEIK (NO ID SEC: 3)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG <u>GSISSYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIW</u> <u>TSGVTDYNSALMGRVTISVDTSKNQF</u> SLKLSSVTAADTAVYYCAR <u>X₁X₂DYDR</u> <u>YTX₃DY</u> WGQGTLLTVSS En donde X ₁ , X ₂ , y X ₃ son cualesquiera aminoácidos de presencia natural (NO ID SEC: 84)
h7E6_S VG2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA <u>SKSVSTSGYSYMH</u> WYQQKPGQPP KLLIY <u>LASNLES</u> GVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYC <u>QHSREL</u> <u>PYT</u> FGQGTKLEIK (NO ID SEC: 3)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG <u>GSISSYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIW</u> <u>TSGVTDYNSALMGRVTISVDTSKNQF</u> SLKLSSVTAADTAVYYCAR <u>X₁X₂DYDR</u> <u>YTX₃DY</u> WGQGTLLTVSS donde X ₁ y X ₂ son cualesquiera aminoácidos de presencia natural; X ₃ is E or M (NO ID SEC: 85)
h7E6_S VGL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA <u>SKSVSTSLYSYMH</u> WYQQKPGQPPK LLIY <u>LASNLES</u> GVPDRFSGSGSGTD FTLTISLQAEDVAVYYC <u>QHSREL</u> <u>PY</u> <u>T</u> FGQGTKLEIK (NO ID SEC: 6)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG <u>GSISSYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIW</u> <u>TSGVTDYNSALMGRVTISVDTSKNQF</u> SLKLSSVTAADTAVYYCAR <u>DGDYDRY</u> <u>TMDY</u> WGQGTLLTVSS (NO ID SEC: 5)
h7E6_S VGN	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA <u>SKSVSTSNYSYMH</u> WYQQKPGQPP KLLIY <u>LASNLES</u> GVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYC <u>QHSREL</u> <u>PYT</u> FGQGTKLEIK	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG <u>GSISSYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIW</u> <u>TSGVTDYNSALMGRVTISVDTSKNQF</u> SLKLSSVTAADTAVYYCAR <u>DGDYDRY</u> <u>TMDY</u> WGQGTLLTVS

mAb	Cadena Ligera	Cadena Pesada
	(NO ID SEC: 7)	S (NO ID SEC: 5)
m6G11	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSC <u>RAS</u> <u>QTIGTSI</u> HWYQQRRTNGSPRLLI <u>YAS</u> <u>ESIS</u> GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSV ESEDIADYYC <u>QQSNSWPFT</u> FGSGT KLEIK (NO ID SEC: 8)	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKAS <u>GYTFTSY</u> WINWVKQRPGHGLEWIGNI <u>YPSDSYS</u> SNYNQKFKDKATLTVDKSSS TAYMQVSSPTSEDSAVYYCTY <u>GSSF</u> <u>DY</u> WGQGTTVTVSS (NO ID SEC: 9)
h6G11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RAS</u> <u>QTIGTSI</u> HWYQQKPGQAPRLLI <u>YAS</u> <u>ESIS</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISSE PEDFAVYYC <u>QQSNSWPFT</u> FGQGTK LEIK (NO ID SEC: 10)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GYTFTSY</u> WINWVRQAPGGGLEWMG <u>NIYPSDSYS</u> SNYNQKFKDRVTMTDRDTS TSTVYMESSLRSEDTAVYYCARG <u>GSS</u> <u>FDY</u> WGQGTTLVTVSS (NO ID SEC: 11)
H6G11 _FKG_ SF	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RAS</u> <u>QTIGTSI</u> HWYQQKPGQAPRLLI <u>YAS</u> <u>ESIS</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISSE PEDFAVYYC <u>SQSFSWPFT</u> FGQGTK LEIK (NO ID SEC: 12)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GYTFTSY</u> WINWVRQAPGGGLEWMG <u>NIFPSDSYS</u> SNYNKKFKDRVTMTDRDTS TSTVYMESSLRSEDTAVYYCARG <u>GSG</u> <u>FDY</u> WGQGTTLVTVSS (NO ID SEC: 13)

En el Cuadro 1, las secuencias subrayadas son secuencias CDR de acuerdo con Kabat y en negrillas de acuerdo con Chothia.

- 5 La invención proporciona también porciones CDR de anticuerpos para Trop-2 (que incluyen CDRs Chothia, CDRs Kabat, y regiones de contacto CDR). La determinación de las regiones CDR está dentro de la experiencia de la técnica. Se comprende que en ciertas modalidades, las CDRs pueden ser una combinación de
- 10 las CDR de Kabat y Chothia (denominadas también como "CRs combinadas" o "CDRs extendidas"). En ciertas modalidades, las CDRs son las CDRs Kabat. En otras modalidades, las CDRs son las CDRs Chothia. Dicho de otra manera, en modalidades con más de una CDR, las CDRs pueden ser cualquiera de Kabat, Chothia, CDRs
- 15 de combinación, o combinaciones de las mismas. El Cuadro 2 muestra ejemplos de secuencias de CDR aquí proporcionadas.

Cuadro 2

Cadena Pesada			
mAb	CDRH1	CDRH2	CDRH3
m7E6	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GFSLTSY (NO ID SEC: 31) (Chothia); GFSLTSYGVH (NO ID SEC: 32) (extendida)	VIWTGGSTDYNSALMS (NO ID SEC: 33) (Kabat) WTGGS (NO ID SEC:34) (Chothia)	DGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 35)
h7E6	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTGGSTDYNSALMS (NO ID SEC: 33) (Kabat) WTGGS (NO ID SEC:34) (Chothia)	DGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 35)
h7E6_S VG	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 35)
h7E6_S VG1	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	X ₁ X ₂ DYDRYTX ₃ DY donde X ₁ , X ₂ , y X ₃ son cualesquiera aminoácidos de presencia natural (NO ID SEC: 86)

	(extendida)		
h7E6_S VG2	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	$X_1X_2DYDRYTX_3DY$ donde X_1 y X_2 , son cualesquiera aminoácidos de presencia natural; donde X_3 es E o M (NO ID SEC: 87)
h7E6_S VG3	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	$DYDRYTX_1DY$ donde X_1 es cualquier aminoácido de presencia natural; (NO ID SEC: 83)
h7E6_S VG4	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	$DYDRYTX_1DY$ donde X_1 es E o M (NO ID SEC: 82)
h7E6_S VG5	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	$IGDYDRYTMDY$ (NO ID SEC: 103)
h7E6_S VG6	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (SEQ ID	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39)	$YGDYDRYTMDY$ (NO ID SEC: 104)

	NO: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	(Chothia)	
h7E6_S VG7	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	FGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 105)
h7E6_S VG8	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	HGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 106)
h7E6_S VG9	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	AGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 107)
h7E6_S VG10	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	TGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 108)

h7E6_S VG11	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	SGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 109)
h7E6_S VG12	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	IGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 110)
h7E6_S VG13	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	RGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 111)
h7E6_S VG14	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	VG DYDRYTMDY (NO ID SEC: 112)
h7E6_S VG15	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia);	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	WGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 113)

	GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)		
h7E6_S VG16	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	QGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 114)
h7E6_S VG17	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	GGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 115)
h7E6_S VG18	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	KGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 116)
h7E6_S VG19	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DSDYDRYTMDY (NO ID SEC: 117)
h7E6_	SYGVH (NO ID SEC:	VIWTSGVTDYNSALMG	DKDYDRYTMDY

SVG20	30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	(NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	(NO ID SEC: 118)
h7E6_S VG21	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DHDYDRYTMDY (NO ID SEC: 119)
h7E6_S VG22	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DADYDRYTMDY (NO ID SEC: 120)
h7E6_S VG23	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DFDYDRYTMDY (NO ID SEC: 121)
h7E6_S VG24	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (SEQ	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DTDYDRYTMDY (NO ID SEC: 122)

	ID NO: 37) (extendida)		
h7E6_S VG25	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DRDYDRYTMDY (NO ID SEC: 123)
h7E6_S VG26	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DVDYDRYTMDY (NO ID SEC: 124)
h7E6_S VG27	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DQDYDRYTMDY (NO ID SEC: 125)
h7E6_S VG28	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DLDYDRYTMDY (NO ID SEC: 126)
H7E6_ SVG29	SYGVH (NO ID SEC: 30) (kabat);	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat)	DYDYDRYTMDY (NO ID SEC: 127)

	GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	
h7E6_S VG30	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DEDYDRYTMDY (NO ID SEC: 128)
h7E6_S VG31	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DNDYDRYTMDY (NO ID SEC: 129)
h7E6_S VG32	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DWDYDRYTMDY (NO ID SEC: 130)
h7E6_S VGL	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 35)

	(extendida)		
h7E6_S VGL1	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DSDYDRYTMDY (NO ID SEC: 117)
h7E6_S VGL2	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DKDYDRYTMDY (NO ID SEC: 118)
h7E6_S VGL3	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DADYDRYTMDY (NO ID SEC: 120)
h7E6_S VGL4	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DLDYDRYTMDY (NO ID SEC: 126)
h7E6_S VGL5	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39)	DEDYDRYTMDY (NO ID SEC: 128)

	SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	(Chothia)	
h7E6_S VGN	SYGVH (NO ID SEC: 30) (Kabat); GGSISSY (NO ID SEC: 36) (Chothia); GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37) (extendida)	VIWTSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) (Kabat) WTSGV (NO ID SEC:39) (Chothia)	DGDYDRYTM DY (NO ID SEC: 35)
h7E6 Consen so de Cadena Pesada	GX ₁ SX ₂ X ₃ SY donde X ₁ es F o G; X ₂ es L o I; X ₃ es T o S (NO ID SEC: 76) (Chothia); GX ₁ SX ₂ X ₃ SYGVH donde X ₁ es F o G; X ₂ es L o I; X ₃ es T o S (NO ID SEC: 77)	VIWTX ₁ GX ₂ TDYNSALMX ₃ donde X ₁ es G o S; X ₂ es S o V; X ₃ es S o G (NO ID SEC: 49) (Kabat) WTX ₁ GX ₂ donde X ₁ es G o S; X ₂ es S o V (NO ID SEC: 50) (Chothia)	X ₁ X ₂ DYDRYTX ₃ DY donde X ₁ , X ₂ , y X ₃ son cualesquiera aminoácidos de presencia natural (NO ID SEC: 86) X ₁ X ₂ DYDRYTX ₃ DY donde X ₁ y X ₂ , son cualquiera aminoácidos de presencia natural; donde X ₃ es E o M (NO ID SEC: 87) DYDRYTX ₁ DY donde X ₁ es cualquier aminoácido de presencia natural; (NO ID SEC: 83) DYDRYTX ₁ DY donde X ₁ es E o M (NO ID SEC: 82)

m6G11	SYWIN (NO ID SEC: 40) (Kabat); GYTFTSY (NO ID SEC: 41) (Chothia); GYTFTSYWIN (NO ID SEC: 42) (extendida)	NIYPSDSYSNYNQKFKD (NO ID SEC: 43) (Kabat) YPSDSY (NO ID SEC: 44) (Chothia)	GSSFDY (NO ID SEC: 45)
h6G11	SYWIN (NO ID SEC: 40) (Kabat); GYTFTSY (NO ID SEC: 41) (Chothia); GYTFTSYWIN (NO ID SEC: 42) (extendida)	NIYPSDSYSNYNQKFKD (NO ID SEC: 43) (Kabat) YPSDSY (NO ID SEC: 44) (Chothia)	GSSFDY (NO ID SEC: 45)
h6G11_FKG_SF	SYWIN (NO ID SEC: 40) (Kabat); GYTFTSY (NO ID SEC: 41) (Chothia); GYTFTSYWIN (NO ID SEC: 42) (extendida)	NIFPSDSYSNYNKKFKD (NO ID SEC: 46) (Kabat) FPSDSY (NO ID SEC: 47) (Chothia)	GSGFDY (NO ID SEC: 48)
h6G11 Consen so de Cadena Pesada		NIX ₁ PSDSYSNYNX ₂ KFKD donde X ₁ es Y o F; X ₂ es Q o K (NO ID SEC: 51) (Kabat) X ₁ PSDSY donde X ₁ es Y o F (NO ID SEC: 52) (Chothia)	GSX ₁ FDY donde X ₁ es S o G (NO ID SEC: 53)
Cadena Ligera			
mAb	CDRL1	CDRL2	CDRL3
m7E6	RASKSVSTSGYSYMH (NO ID SEC: 54)	LASNLES (NO ID SEC: 55)	QHSRELPYT (NO ID SEC: 56)
h7E6	RASKSVSTSGYSYMH	LASNLES (NO ID SEC: 55)	QHSRELPYT (NO

	(NO ID SEC: 54)		ID SEC: 56)
h7E6_S VG (incluye h7E6_S VG1 hasta h7E6_S VG32	RASKSVSTSGYSYMH (NO ID SEC: 54)	LASNLES (NO ID SEC: 55)	QHSRELPYT (NO ID SEC: 56)
h7E6_S VGL (incluye h7E6_S VGL1 hasta h7E6_S VGL5	RASKSVSTSLYSYMH (NO ID SEC: 57)	LASNLES (NO ID SEC: 55)	QHSRELPYT (NO ID SEC: 56)
h7E6_S VGN	RASKSVSTSNYSYMH (NO ID SEC: 58)	LASNLES (NO ID SEC: 55)	QHSRELPYT (NO ID SEC: 56)
h7E6 Consen so de Cadena Ligera	RASKSVSTSX ₁ YSYMH donde X ₁ es G, L, o N (NO ID SEC: 63)		
m6G11	RASQTIGTSIH (NO ID SEC: 59)	YASESIS (NO ID SEC: 60)	QQSNSWPFT (NO ID SEC: 61)
h6G11	RASQTIGTSIH (NO ID SEC: 59)	YASESIS (NO ID SEC: 60)	QQSNSWPFT (NO ID SEC: 61)

h6G11_FKG_SF	RASQTIGTSIH (NO ID SEC: 59)	YASESIS (NO ID SEC: 60)	SQSFSWPFT (NO ID SEC: 62)
h6G11 Consenso de Cadena Ligera			X ₁ QSX ₂ SWPFT donde X ₁ es Q o S; X ₂ es N o F (NO ID SEC:64)

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se enlaza a Trop-2 y compite con el anticuerpo como se describe en la presente, tal como

5 m7E6, h7E6, h7E6_SVG, h7E6_SVG1, h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6, h7E6_SVG7, h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11, h7E6_SVG12, h7E6_SVG13, h7E6_SVG14, h7E6_SVG15, h7E6_SVG16, h7E6_SVG17, h7E6_SVG18,

10 h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23, h7E6_SVG24, h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27, h7E6_SVG28, h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31, h7E6_SVG32, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5,

15 h7E6_SVGN, m6G11, h6G11, o h6G11_FKG_SF. En ciertas modalidades, el anticuerpo compite por el enlace de Trop-2 con el anticuerpo h7E6_SVG, h7E6_SVG4, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG22, h7E6_SVG28, h7E6_SVG30, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3,

20 h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h7E6_SVGN, o h6G11_FKG_SF. En ciertas modalidades, el anticuerpo compite por el enlace de Trop-2 con el anticuerpo h7E6_SVG y tiene una afinidad de enlace de anticuerpo monovalente (K_D) de aproximadamente cualquiera de o menor a aproximadamente cualquiera de 6.5

25 nM, 6.0 nM, 5.5 nM, 5.0 nM, 4.5 nM, 4.0 nM, 3.5 nM, 3.0 nM,

2.5 nM, 2.0 nM, 1.5 nM, 1.0 nM, 0.5 nM, o 0.25 nM como se midió a través de resonancia plasmónica de superficie. En ciertas modalidades, el anticuerpo compite con el enlace de Trop-2 con el anticuerpo h7E6 y tiene una afinidad de enlace de anticuerpo monovalente (K_D) de aproximadamente cualquiera de o menor a aproximadamente cualquiera de 30 nM, 25 nM, 22 nM, 20 nM, 15 nM, o 10 nM. En ciertas modalidades, el anticuerpo competidor no comprende la región de cadena pesada de la secuencia QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLG VIWTGGSTDYNSALMSRLSINKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARD GDYDRYTMDYWGQGTSTVTVSS (NO ID SEC: 2) y una región variable de cadena ligera de la secuencia DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWWYQQKPGQPPK LLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELP YTFGGGTKLEIK (NO ID SEC: 1). En ciertas modalidades, el anticuerpo competidor no es un anticuerpo AR47A6.4.2, AR52A301.5, AR36A36.11.1, BR110 o RS7.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno, que se enlaza de manera específica a Trop-2, en donde el anticuerpo comprende una región VH que comprende una secuencia mostrada en NO ID SEC: 5, 84, u 85; y/o una región VL que comprende una secuencia mostrada en NO ID SEC: 3. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWWYQQKPGQPP KLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSREL PYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (NO ID SEC: 66) y una cadena pesada que comprende la secuencia QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYGVHWIRQPPGKGLEWIG VIWTSGVTDYNSALMGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARD GDYDRYTMDYWGQGTSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL

GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
 5 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (NO ID SEC: 65).

En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia NO ID SEC: 66 y una cadena pesada que comprende la secuencia NO ID SEC: 101 o 102.

10 En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno, que se enlaza de manera específica a Trop-2, en donde el anticuerpo comprende una región VH que comprende una secuencia mostrada en NO ID SEC: 13; y/o una región VL
 15 que comprende una secuencia mostrada en NO ID SEC: 12. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTIGTSIHWWYQQKPGQAPR
 LLIYYASESISGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCSQSF
 20 SWPFTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (NO ID SEC:
 68) y una cadena pesada que comprende la secuencia
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVVINWVRQAPGQ
 25 GLEWMGNIFPSDSYSNKKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR
 SEDTAVYYCARGSGFDYVVGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 30 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (NO ID SEC: 67).

En ciertas modalidades, la invención proporciona también porciones CDR de anticuerpos para los anticuerpos Trop-2 en base a las regiones de contacto CDR. Las regiones de contacto CDR son regiones de un anticuerpo que imbuyen la especificidad al anticuerpo para un antígeno. En general, regiones de contacto CDR incluyen las posiciones de residuo en las CDRs y las zonas Vernier que están restringidas a fin de mantener la estructura de ciclo adecuada para el anticuerpo a fin de enlazarse a un antígeno específico. Véase por ejemplo, Makabe et al., *J. Biol. Chem.*, 283:1156-1166, 2007. La determinación de regiones de contacto CDR está dentro de la experiencia de la técnica.

La afinidad de enlace (KD) del anticuerpo Trop-2 como se describe en la presente para Trop-2 (tal como Trop-2 humano) puede ser de aproximadamente 0.002 hasta aproximadamente 200 nM. En ciertas modalidades, la afinidad de enlace es cualquiera de aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 45 nM, aproximadamente 40 nM, aproximadamente 35 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 15 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 8 nM, aproximadamente 7.5 nM, aproximadamente 7 nM, aproximadamente 6.5 nM, aproximadamente 6 nM, aproximadamente 5.5 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM, o aproximadamente 2 pM. En ciertas modalidades, la afinidad de enlace es menor a cualquiera de aproximadamente 250 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 7.5 nM,

aproximadamente 7 nM, aproximadamente 6.5 nM,
aproximadamente 6 nM, aproximadamente 5 nM,
aproximadamente 4.5 nM, aproximadamente 4 nM,
aproximadamente 3.5 nM, aproximadamente 3 nM,
5 aproximadamente 2.5 nM, aproximadamente 2 nM,
aproximadamente 1.5 nM, aproximadamente 1 nM,
aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM,
aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM,
aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM, o
10 aproximadamente 2 pM.

En ciertas modalidades, la afinidad de enlace (por ejemplo, enlace de anticuerpo monovalente) de los anticuerpos como se describe en la presente es de aproximadamente 35 nM o menos como se midió a través de resonancia plasmónica de superficie. En ciertas modalidades, la afinidad de enlace (por ejemplo, enlace de anticuerpo monovalente) de los anticuerpos como se describe en la presente es de aproximadamente 6.5 nM o menos como se midió a través de resonancia plasmónica de superficie.

La invención proporciona también métodos para elaborar estos anticuerpos. Los anticuerpos de esta invención se pueden elaborar a través de procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos se pueden elaborar por medio de degradación proteolítica u otra de los anticuerpos, a través de métodos recombinantes (es decir, polipéptidos individuales o de fusión) como se describió con anterioridad o mediante síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, en especial los polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, son elaborados de manera conveniente a través de síntesis química. Los métodos de síntesis química son conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles. Por ejemplo, se podría generar un anticuerpo a través de un sintetizador de polipéptido automatizado que emplea el método de fase sólida. Véanse también, las Patentes de los

Estados Unidos Nos. 5,807,715; 4,816,567; y 6,331,415.

En otra alternativa, los anticuerpos se pueden elaborar de modo recombinante utilizando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. En una modalidad, un polinucleótido
 5 comprende una secuencia que codifica las regiones variables de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo m7E6, h7E6, h7E6_SVG, h7E6_SVG1, h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6, h7E6_SVG7, h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11, h7E6_SVG12, h7E6_SVG13, h7E6_SVG14,
 10 h7E6_SVG15, h7E6_SVG16, h7E6_SVG17, h7E6_SVG18, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23, h7E6_SVG24, h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27, h7E6_SVG28, h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31, h7E6_SVG32, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5,
 15 h7E6_SVGN, m6G11, h6G11, o h6G11_FKG_SF. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés se puede mantener en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede ser expandida y congelada para uso futuro. Los vectores (que incluyen vectores de
 20 expresión) y las células huésped se describen de manera adicional en la presente.

La invención comprende también scFv de los anticuerpos de la presente. Los fragmentos de región variable de cadena individual se elaboran por medio del enlace de las regiones variables de cadena
 25 pesada y/o ligera a través del uso de un péptido de enlace corto (Bird et al., Science 242:423-426, 1988). Un ejemplo de un péptido de enlace es (GGGGS)₃ (NO ID SEC: 80), que une aproximadamente 3.5 nm entre el extremo carboxi de una región variable y extremo amino de la otra región variable. Se han diseñado y utilizado
 30 ligadores de las otras secuencias (Bird et al., 1988, supra). Los ligadores serán polipéptidos flexibles, cortos y de preferencia comprendidos de menos de aproximadamente 20 residuos aminoácido. Los ligadores pueden a su vez ser modificados para funciones adicionales, tales como unión de los fármacos a soportes

sólidos. Las variantes de cadena individual se pueden producir ya sea de manera recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, se puede emplear un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, un polinucleótido que contiene plásmido adecuado que codifica el scFv puede ser introducido dentro de la célula huésped, ya sea célula eucariótica tal como levadura, vegetal, de insecto o de mamífero, o procariótica, tal como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés se pueden elaborar a través de manipulaciones de rutina tal como ligadura de polinucleótidos. El resultante scFv puede ser aislado utilizando técnicas de purificación de proteína estándar conocidas en la técnica.

Están comprendidas también otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos, bivalentes en los cuales los dominios variable de cadena pesada (VH) y variable de cadena ligera (VL) son expresados en una cadena de polipéptido sencilla, aunque utilizando un ligador que es demasiado corto para permitir el apareo entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de este modo a que los dominios se apareen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de enlace de antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993; Poljak, R. J., et al., *Structure* 2:1121-1123, 1994). El minicuerpo incluye los dominios VL y VH de un anticuerpo nativo fusionado a la región de bisagra y el dominio CH3 de la molécula de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, US5,837,821

Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de enlace para al menos dos antígenos diferentes, pueden ser preparados utilizando los anticuerpos descritos en la presente. Los métodos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos

en la técnica (véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210, 1986). De manera común, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basó en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, con las dos cadenas pesadas que tienen
5 diferentes especificidades (Millstein and Cuello, *Nature* 305, 537-539, 1983).

De acuerdo con un enfoque para elaborar anticuerpos biespecíficos, los dominios variables de anticuerpo con las
10 especificidades de enlace deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a las secuencias de región constante de inmunoglobulina. De preferencia, la fusión es con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, las regiones CH2 y
15 CH3. Se prefiere tener la primera región de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para enlace de cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de cadena ligera de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, son insertados en
20 vectores de expresión separados, y son cotransfectados en un organismo huésped adecuado. Esto brinda una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en la modalidad cuando las relaciones distintas de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción
25 proporcionan rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos de las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en relaciones iguales en altos rendimientos o cuando las relaciones no son de particular
30 importancia.

En un enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de enlace en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona

una segunda especificidad de enlace) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera de inmunoglobulina sólo en la mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas. Este enfoque se describe en la Publicación PCT No. WO 94/04690.

En otro enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de modificación aminoácido en la primera región de bisagra en un brazo, y el aminoácido sustituido/remplazado en la primera región de bisagra tiene una carga opuesta al aminoácido correspondiente en la segunda región de bisagra en el otro brazo. Este enfoque se describe en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2011/36419 (WO2011/143545).

En otro enfoque, los anticuerpos biespecíficos pueden ser generados utilizando un marcador de péptido que contiene glutamina modificado genéticamente para el anticuerpo dirigido a un epítipo (por ejemplo, Trop-2) en un brazo y otro marcador péptido (por ejemplo, un marcador péptido que contiene Lys o un Lys endógeno reactivo) modificado genéticamente para un segundo anticuerpo dirigido a un segundo epítipo en otro brazo en presencia de transglutaminasa. Este enfoque se describe en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/IB2011/054899 (WO2012/059882).

Los anticuerpos heteroconjugados, que comprenden dos anticuerpos unidos de manera covalente, también están dentro del alcance de la invención. Dichos anticuerpos han sido usados para dirigir células del sistema inmune hacia células indeseables (Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980), y para tratamiento de la infección de VIH (Publicaciones PCT Nos. WO 91/00360 y WO 92/200373; EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden elaborar utilizando

cualesquiera métodos de enlace cruzado convenientes. Los agentes y técnicas de enlace cruzado adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980.

5 Los anticuerpos quiméricos o híbridos también pueden ser preparados *in vitro* utilizando métodos conocidos de química de proteína sintética, que incluyen aquellos que involucran agentes de enlace cruzado. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden ser construidas usando una reacción de intercambio de disulfuro o a
10 través de la formación de un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

En los anticuerpos humanizados recombinantes, la porción Fc γ puede ser modificada para evitar la interacción con el receptor Fc γ y el complemento y los sistemas inmunes. Las técnicas para la
15 preparación de dichos anticuerpos se describen en WO 99/58572. Por ejemplo, la región constante puede ser diseñada para asemejarse más a las regiones constantes humanas a fin de evitar la respuesta inmune si el anticuerpo es empleado en pruebas y
20 tratamientos clínicos en seres humanos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,997,867 y 5,866,692.

La invención abarca modificaciones a los anticuerpos y polipéptidos de las variantes de la invención mostradas en el Cuadro 1, que incluyen anticuerpos funcionalmente equivalentes
25 que no afectan de manera significativa sus propiedades y variantes que tienen actividad y/o afinidad mejorada o reducida. Por ejemplo, la secuencia de aminoácido puede ser mutada para obtener un anticuerpo con la afinidad de enlace deseada para Trop-2. La modificación de polipéptidos es una práctica rutinaria en la técnica
30 y no necesita de una descripción detallada en la presente. Los ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos aminoácido, una o más eliminaciones o adiciones de aminoácidos que no cambian de manera perjudicial significativa la actividad funcional, o que

maduran (mejoran) la afinidad del polipéptido para su ligando, o el uso de análogos químicos.

Las inserciones de secuencia de aminoácido incluyen fusiones de extremo amino- y/o carboxilo que varían de longitud de un residuo para los polipéptidos que contienen una centena o más de residuos, así como las inserciones intersecuencia de residuos aminoácido individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un marcador epítipo. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N- o extremo C- del anticuerpo de una enzima o un polipéptido lo cual incrementa la vida media del anticuerpo en la circulación sanguínea.

Las variantes de sustitución tienen por lo menos un residuo aminoácido en la molécula de anticuerpo removida y un residuo diferentes insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, aunque también están consideradas las alteraciones FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en el Cuadro 3 bajo el encabezado de "sustituciones conservadoras". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, se pueden introducir entonces más cambios sustanciales, denominados "sustituciones de ejemplo" en el Cuadro 3, o como se describe de modo adicional a continuación con referencia a residuos de aminoácido, y los productos analizados.

Cuadro 3: Sustituciones Aminoácido

Residuo Original (aminoácido de presencia natural)	Sustituciones Conservadoras	Sustituciones de Ejemplo
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr

Residuo Original (aminoácido de presencia natural)	Sustituciones Conservadoras	Sustitución Ilustrativa
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran al seleccionar sustituciones que difieren de manera significativa en su efecto para mantener (a) la estructura de la cadena principal de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio de objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos aminoácido de presencia natural son divididos en grupos en base a las propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) No-polar: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Polar sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gin;
- (3) Ácido (con carga negativa): Asp, Glu;
- (4) Básico (con carga positiva): Lys, Arg;
- (5) Residuos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro; y
- (6) Aromático: Trp, Tyr, Phe, His.

Se realizan sustituciones no conservadoras por medio de intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no involucrado en el mantenimiento de la conformación adecuada del anticuerpo

también puede ser sustituido, generalmente con serina, a fin de mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar enlace cruzado aberrante. De manera inversa, se pueden agregar enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad, en particular
5 cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv.

Las modificaciones de aminoácido pueden variar desde el cambio o modificación de uno o más aminoácidos para completar el rediseño de una región, tal como la región variable. Los cambios en
10 la región variable pueden alterar la afinidad y/o la especificidad de enlace. En ciertas modalidades, se efectúan no más de cinco sustituciones aminoácido consecutivas dentro de un dominio CDR. En otras modalidades, no más de una a tres sustituciones conservadoras de aminoácido son efectuadas dentro de un dominio CDR. En otras
15 modalidades más, el dominio CDR es CDR H3 y/o CDR L3.

Las modificaciones incluyen también polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones post-translacionales, como, por ejemplo, glicosilación con diferentes azúcares, acetilación, y fosforilación. Los anticuerpos son
20 glicosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis and Lund, Chem. Immunol. 65:111-128, 1997; Wright and Morrison, TibTECH 15:26-32, 1997). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas que afectan la función de la proteína (Boyd et al., Mol. Immunol. 32:1311-1318, 1996; Wittwe and
25 Howard, Biochem. 29:4175-4180, 1990) y la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína, que pueden afectar la conformación y la superficie tridimensional presentada de la glicoproteína (Jefferis and Lund, supra; Wyss and Wagner, Current Opin. Biotech. 7:409-416, 1996). Los oligosacáridos pueden servir
30 también para dirigir una glicoproteína determinada hacia ciertas moléculas en base a estructuras de reconocimiento específicas. Se ha reportado que la glicosilación de anticuerpos afecta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). En particular, se reportó que las células CHO con expresión regulada

por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una formación catalizadora de glicosiltransferasa de GlcNAc bisectada, tienen actividad ADCC mejorada (Umana et al., *Mature Biotech.* 17:176-180, 1999).

5 De manera común la glicosilación de anticuerpos está N-vinculada u O-vinculada. N-vinculada se refiere a la unión de la porción carbohidrato de la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina, y asparagina-X-cisteína, en donde X es
10 cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la porción carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La
15 glicosilación O-vinculada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un ácido hidroxiamino, de manera más común serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra
20 de manera conveniente al alterar la secuencia de aminoácido de manera que contiene una o más de las secuencias de tripéptido antes citadas (para sitios de glicosilación N-vinculada). La alteración se puede realizar a través de la adición de, o la sustitución de, uno más residuos de serina o
25 treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación O-vinculada).

El patrón de glicosilación de anticuerpos también puede ser alterado sin alterar la secuencia de nucleótido subyacente. La glicosilación depende en gran medida de la célula huésped
30 usada para expresar el anticuerpo. Ya que el tipo de célula utilizado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo anticuerpos, como agentes terapéuticos potenciales es raramente la célula nativa, se pueden esperar variaciones en el patrón de glicosilación de los anticuerpos

(véase, por ejemplo, Hse et al., J. Biol. Chem. 272:9062-9070, 1997).

Además de la elección de las células huéspedes, los factores que afectan la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, la formulación de medio, la densidad de cultivo, oxigenación, pH, esquemas de purificación y similares. Se han propuestos varios métodos para alterar el patrón de glicosilación logrado en organismo huésped particular que incluyen la introducción o sobreexpresión de ciertas enzimas involucradas en la producción de oligosacárido (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,047,335; 5,510,261 y 5,278,299). La glicosilación, o ciertos tipos de glicosilación, pueden ser enzimáticamente removidos desde la glicoproteína, por ejemplo, utilizando endoglicosidasa H (Endo H), N-glicosidasa F, endoglicosidasa F1, endoglicosidasa F2, endoglicosidasa F3. Además, la célula huésped puede ser genéticamente modificada para ser deficiente en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas y otras técnicas similares son bien conocidas en la técnica.

Otros métodos de modificación incluyen utilizar técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, que incluyen, aunque no se limitan a, medios enzimáticos, sustitución oxidante y quelación. Las modificaciones pueden ser utilizadas por ejemplo, para unión de marcadores para inmunoensayo. Los polipéptidos modificados son elaborados usando procedimientos establecidos en la técnica y pueden ser tamizados utilizando ensayos estándar conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación y en los Ejemplos.

En ciertas modalidades de la invención, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que tiene una afinidad incrementada para un receptor Fc gamma humano, es inmunológicamente inerte o parcialmente inerte, por ejemplo no activa la lisis mediada por complemento, no estimula la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC), ni activa los macrófagos; ni tiene actividades reducidas (en comparación con el anticuerpo no modificado) en uno o más de los

siguientes: activación de la lisis mediada por complemento, estimulación de citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC), o activación de microglía. Se pueden utilizar diferentes modificaciones de la región constante para

5 lograr el nivel óptimo y/o combinación de funciones efectoras. Véase, por ejemplo, Morgan et al., *Immunology* 86:319-324, 1995; Lund et al., *J. Immunology* 157:4963-9 157:4963-4969, 1996; Idusogie et al., *J. Immunology* 164:4178-4184, 2000; Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601, 1989; y Jefferis et al.,

10 *Immunological Reviews* 163:59-76, 1998. En ciertas modalidades, la región constante es modificada como se describe en *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29:2613-2624; Solicitud PCT No. PCT/GB99/01441; y/o Solicitud de Patente de RU No. 9809951.8. En otras modalidades, el anticuerpo comprende una

15 región constante IgG2 de cadena pesada humana que comprende las siguientes mutaciones: A330P331 para S330S331 (numeración de aminoácido con referencia a la secuencia IgG2 natural). *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29:2613-2624. En otras modalidades más, la región constante es aglicosilada

20 para la glicosilación N-vinculada. En ciertas modalidades, la región constante es aglicosilada para la glicosilación N-vinculada a través de mutación del residuo de aminoácido glicosilado o los residuos flanqueadores que son parte de la secuencia de reconocimiento de N-glicosilación en la región

25 constante. Por ejemplo, el sitio de N-glicosilación N297 puede ser mutado para A, Q, K, o H. Véase, Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601, 1989; and Jefferis et al., *Immunological Reviews* 163:59-76, 1998. En ciertas modalidades, la región constante es aglicosilada para la glicosilación N-vinculada. La

30 región constante puede ser aglicosilada para la glicosilación N-vinculada enzimáticamente (por ejemplo, al remover el carbohidrato por medio de la enzima PNGase), o mediante la expresión en una célula huésped deficiente para glicosilación.

Otras modificaciones de anticuerpo incluyen anticuerpos

que han sido modificados como se describe en la Publicación PCT No. WO 99/58572. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de enlace dirigido a la molécula de objetivo, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácido sustancialmente homóloga para toda o parte de una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de enlazar la molécula de objetivo sin activar la lisis dependiente de complemento significativa, o destrucción mediada por célula del objetivo. En ciertas modalidades, el dominio efector es capaz de enlazar de manera específica FcRn y/o FcγRIIb. Estos se basan de manera común en los dominios quiméricos derivados a partir de dos o más dominios CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina. Los anticuerpos modificados de esta manera son particularmente adecuados para uso en la terapia de anticuerpo crónica, a fin de evitar las reacciones inflamatorias u otras adversas para la terapia de anticuerpo convencional.

La invención incluye modalidades maduradas de afinidad. Por ejemplo, los anticuerpos madurados de afinidad pueden ser producidos a través de procedimientos conocidos en la técnica (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783, 1992; Barbas et al., *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813, 1994; Schier et al., *Gene*, 169:147-155, 1995; Yelton et al., *J. Immunol.*, 155:1994-2004, 1995; Jackson et al., *J. Immunol.*, 154(7):3310-9, 1995, Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226:889-896, 1992; y la Publicación PCT No. W02004/058184).

Los siguientes métodos pueden ser empleados para ajustar la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR. Una forma de caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o alterar (por ejemplo, mejorar) la afinidad de enlace de un polipéptido, tal como un anticuerpo, denominado "mutagénesis mediante alanina de biblioteca". En general, la mutagénesis mediante alanina de biblioteca funciona como sigue. Una o más posiciones de aminoácido en la CDR son remplazadas con dos o más (tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20) aminoácidos utilizando

métodos reconocidos en la técnica. Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en ciertas modalidades, una para cada posición de aminoácido que es analizada), cada una con una complejidad de dos o más miembros (si dos o más aminoácidos son sustituidos en cada posición). En general, la biblioteca incluye también un clon que comprende el aminoácido natural (no sustituido). Un pequeño número de clones, por ejemplo, aproximadamente 20-80 clones (dependiendo de la complejidad de la biblioteca), a partir de cada biblioteca son revisados para afinidad de enlace al polipéptido de objetivo (u otro objetivo de enlace), y se identifican candidatos con enlace incrementando, similar, reducido o sin enlace. Los métodos para determinar la afinidad de enlace son bien conocidos en la técnica. La afinidad de enlace se puede determinar utilizando el análisis de resonancia plasmónica de superficie Biacore™, el cual detecta las diferencias en la afinidad de enlace de aproximadamente 2 veces o más. Biacore™ es de particular utilidad cuando el anticuerpo de partida ya está enlazado con una afinidad relativamente elevada, por ejemplo una K_D de aproximadamente 10 nM o menos. El tamizado utilizando resonancia plasmónica de superficie Biacore™ se describe en los Ejemplos de la presente.

La afinidad de enlace se puede determinar utilizando Kinexa Biocensor, ensayos de proximidad por centelleo, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN), extinción de fluorescencia, transferencia de fluorescencia, y/o exhibición de levadura. La afinidad de enlace también puede ser tamizada utilizando un bioensayo adecuado.

En ciertas modalidades, cada posición de aminoácido en una CDR es remplazada (en ciertas modalidades, una a la vez) con los 20 aminoácidos naturales utilizando métodos de mutagénesis reconocidos en la técnica (algunos de los cuales se describen en la presente). Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en ciertas modalidades, una para cada posición de

aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de 20 miembros (si los 20 aminoácidos son sustituidos en cada posición).

En ciertas modalidades, la biblioteca que se va a revisar comprende sustituciones en dos o más posiciones, que pueden estar
5 en la misma CDR o en dos o más CDRs. Por tanto, la biblioteca puede comprender sustituciones en dos o más posiciones en una CDR. La biblioteca puede comprender la sustitución en dos o más posiciones en dos o más CDRs. La biblioteca puede comprender sustitución en 3, 4, 5, o más posiciones, dichas posiciones
10 encontradas en dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs. La sustitución se puede preparar utilizando codones de baja redundancia. Véase por ejemplo, Cuadro 2 de Balint et al., Gene 137(1):109-18, 1993.

La CDR puede ser CDRH3 y/o CDRL3. La CDR puede tener una o más de CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, y/o CDRH3. La
15 CDR puede ser una CDR de Kabat, una CDR de Chothia, o una CDR extendida.

Los candidatos con enlace mejorado pueden ser secuenciados, identificando de este modo un mutante de sustitución CDR que da como resultado afinidad mejorada (denominada también sustitución
20 "mejorada"). Los candidatos que se enlazan pueden también ser secuenciados, identificando de este modo una sustitución CDR que retiene el enlace.

Se pueden conducir múltiples rondas de revisión. Por ejemplo, los candidatos (cada uno que comprende una sustitución aminoácido
25 en una o más posiciones de uno o más CDR) con enlace mejorado también son útiles para el diseño de una segunda biblioteca que contiene por lo menos el aminoácido original y el sustituido en cada posición CDR mejorada (es decir, la posición aminoácido en la CDR en la cual un mutante de sustitución que mostró enlace mejorado).
30 La preparación, y la revisión o selección de esta biblioteca se describe más adelante.

La mutagénesis mediante alanina de la biblioteca proporciona también un medio para caracterizar una CDR, en tanto que la frecuencia de los clones con enlace mejorado, el mismo enlace,

enlace reducido o sin enlace proporciona también información respecto a la importancia de cada posición de aminoácido para la estabilidad del complejo anticuerpo-antígeno. Por ejemplo, si una posición de la CDR retiene el enlace cuando se cambian los 20 aminoácidos, esa posición es identificada como una posición que es improbable que sea requerida para enlace de antígeno. De manera inversa, si una posición de CDR retiene en enlace sólo en un pequeño porcentaje de sustituciones, esa posición es identificada como una posición que es importante para la función de CDR. Por tanto, los métodos de mutagénesis mediante alanina de la biblioteca generan información con respecto a las posiciones en que las CDRs pueden ser cambiadas para muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20 aminoácidos), y las posiciones en las CDRs que no pueden ser cambiadas o que solamente pueden ser cambiadas para unos cuantos aminoácidos.

Los candidatos con afinidad mejorada pueden ser combinados en una segunda biblioteca, la cual incluye el aminoácido mejorado, el aminoácido original en esa posición, y puede incluir además sustituciones adicionales en esa posición, dependiendo de la complejidad de la biblioteca que se desee, o permitidas utilizando el método de revisión o selección deseado. Además, si se desea, la posición de aminoácido adyacente puede ser aleatorizada al menos para dos o más aminoácidos. La aleatorización de aminoácidos adyacentes puede permitir la flexibilidad de conformación adicional en la CDR mutante, lo cual a su vez, permite o facilita la introducción de un mayor número de mutaciones de mejoramiento. La biblioteca puede comprender también la sustitución en posiciones que no mostraron afinidad mejorada en la primera ronda de revisión.

La segunda biblioteca es revisada o seleccionada para los miembros de biblioteca con afinidad de enlace mejorada y/o alterada usando cualquier método conocido en la técnica, que

incluye revisión utilizando el análisis de resonancia plasmónica de superficie Biacore™, y la selección empleando cualquier método conocido en la técnica para selección, que incluye exhibición por fago, exhibición de levadura, y exhibición de ribosoma.

5 La invención comprende también proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones a partir de los anticuerpos de esta invención. En una modalidad, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende por lo menos 10 aminoácidos contiguos de la región de cadena ligera variable mostrada en NOs ID
10 SEC: 1, 3, 6, 7, 8, 10, y 12 y/o por lo menos 10 aminoácidos de la región de cadena pesada variable mostrada en NOs ID SEC: 2, 4, 5, 9, 11, y 13. En otras modalidades, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos aproximadamente 10, por lo menos de aproximadamente 15, por lo menos de aproximadamente 20, por lo
15 menos de aproximadamente 25, o por lo menos de aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región de cadena ligera variable y/o por lo menos de aproximadamente 10, por lo menos de aproximadamente 15, por lo menos de aproximadamente 20, por lo menos de aproximadamente 25, o por lo menos de aproximadamente
20 30 aminoácidos contiguos de la región de cadena pesada variable. En otra modalidad, el polipéptido de fusión comprende una región variable de cadena ligera y/o una región variable de cadena pesada, como se muestra en cualquiera de los pares de secuencia seleccionados entre NOs ID SEC: 1 y 2, 3 y 4, 3 y 5, 6 y 5, 7 y 5, 8 y
25 9, 10 y 11, y 12 y 13. En otra modalidad, el polipéptido de fusión comprende una o más CDR(s). En otras modalidades más, el polipéptido de fusión comprende CDR H3 (VH CDR3) y/o CDR L3 (VL CDR3). Para los propósitos de esta invención, una proteína de fusión contiene uno o más anticuerpos y otra secuencia de aminoácido a la
30 cual no está fijada en la molécula natural, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga a partir de otra región. Las secuencias heterólogas ilustrativas incluyen, aunque no se limitan a un "marcador" tal como un marcador FLAG o un marcador 6His. Los marcadores son bien conocidos en la técnica.

Un polipéptido de fusión puede ser creado a través de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, de manera sintética o recombinante. De manera común, las proteínas de fusión de esta invención son elaboradas a través de la preparación de un polinucleótido de expresión que las codifica utilizando métodos recombinantes aquí descritos, aunque también pueden ser preparadas a través de otros medios conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, síntesis química.

Esta invención proporciona también composiciones que comprenden anticuerpos conjugados (por ejemplo, enlazados) para un agente que facilita el acoplamiento a un soporte sólido (tal como biotina o avidina). Para simplificar, se hará referencia de modo general a anticuerpos con el entendimiento de que esos métodos aplican para cualquiera de las modalidades del anticuerpo Trop-2 descritas en la presente. La conjugación se refiere de manera general a enlazar estos componentes como se describe en la presente. El enlace (el cual por lo general es fijar estos componentes en asociación próxima por lo menos para administración) se puede lograr en cualquier número de modos. Por ejemplo, una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleofílico, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro ácido, o con un grupo alquilo que contiene un grupo saliente adecuado (por ejemplo, haluro) en el otro.

La invención proporciona también polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos de la invención, y vectores y células huésped que comprenden el polinucleótido.

En consecuencia, la invención proporciona polinucleótidos (o composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas), que comprenden polinucleótidos que codifican cualquiera de los

siguientes: m7E6, h7E6, h7E6_SVG, h7E6_SVG1, h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6, h7E6_SVG7, h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11, h7E6_SVG12, h7E6_SVG13, h7E6_SVG14, h7E6_SVG15, h7E6_SVG16, h7E6_SVG17, h7E6_SVG18, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23, h7E6_SVG24, h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27, h7E6_SVG28, h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31, h7E6_SVG32, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h7E6_SVGN, m6G11, h6G11, h6G11_FKG_SF, o cualquier fragmento o parte del mismo que tiene la habilidad para enlazarse a Trop-2.

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos (que incluyen fragmentos de anticuerpo) y polipéptidos descritos en la presente, tales como los anticuerpos y polipéptidos que tienen función efectora deteriorada. Los polinucleótidos pueden ser elaborados y expresados a través de procedimientos conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En otra modalidad, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos aquí descritos. En otras modalidades más, la composición comprende cualquiera o ambos polinucleótidos mostrados en NO ID SEC: 15 y NO ID SEC: 14 a continuación:

m7E6 región variable de cadena pesada

CAGGTCCAACCTGCAGGAATCAGGTCCAGGCCTGGTGAACCGTCTGA
AACCCTGAGCCTGACATGCACCGTGAGCGGTGGTAGTATTAGCTCTTA
CGGCGTCCATTGGATCCGTCAACCGCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGA
TTGGCGTGATCTGGACCGGTGGTAGCACCGACTATAACAGCGCACTG
ATGAGCCGCGTGACCATCTCGGTAGACACGTGCGAAAAACAGTTTCAG
CCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCGGATACCGCTGTTTATTACTG
CGCACGCGACGGGGATTATGATCGCTACACCATGGATTATTGGGGCC

AGGGTACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (NO ID SEC:15)

m7E6 región variable de cadena ligera

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGG
 CAGAGGGCCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTGAGTACATC
 5 TGGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACC
 CAAACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGC
 CAGGTTGAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCC
 ATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTA
 GGGAGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
 10 (NO ID SEC:14)

En otras modalidades, la composición comprende cualquiera o ambos polinucleótidos mostrados en NO ID SEC: 17 y NO ID SEC: 16 a continuación:

h7E6 región variable de cadena pesada

15 CAGGTCCAACTGCAGGAATCAGGTCCAGGCCTGGTGAAACCGTCTGA
 AACCTGAGCCTGACATGCACCGTGAGCGGTGGTAGTATTAGCTCTTA
 CGGCGTCCATTGGATCCGTCAACCGCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGA
 TTGGCGTGATCTGGACCGGTGGTAGCACCGACTATAACAGCGCACTG
 ATGAGCCGCGTGACCATCTCGGTAGACACGTCGAAAAACCAGTTCAG
 20 CCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCGGATACCGCTGTTTATTACTG
 CGCACGCGACGGGGATTATGATCGCTACACCATGGATTATTGGGGCC
 AGGGTACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (NO ID SEC:17)

h7E6 región variable de cadena ligera

GATATCGTAATGACCCAATCTCCGGATTGCTGGCGGTATCACTGGGC
 25 GAACGTGCCACGATTAAGTCCGTGCAAGCAAATCAGTGTGACCTCC
 GGCTACAGCTATATGCACTGGTATCAACAGAAACCGGGCCAGCCGCC
 GAAACTGCTGATCTATCTGGCTAGCAACCTGGAGAGCGGTGTGCCTG
 ATCGCTTTAGTGGCTCCGGTAGCGGTACCGATTTACGCTGACCATCA
 GCTCCCTGCAGGCAGAAGACGTGGCCGTGTATTATTGTCAGCACAGC
 30 CGTGAGCTGCCGTATACTTTTGGCCAGGGGACAAACTGGAAATCAAA
 (NO ID SEC:16)

En otras modalidades más, la composición comprende cualquiera o ambos polinucleótidos mostrados en NO ID SEC: 18 y NO ID SEC: 16 a continuación:

h7E6 SVG región variable de cadena pesada

CAGGTCCAAGTGCAGGAATCAGGTCCAGGCCTGGTGAAACCGTCTGA
 AACCTGAGCCTGACATGCACCGTGAGCGGTGGTAGTATTAGCTCTTA
 CGCGTCCATTGGATCCGTCAACCGCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGATT
 5 GCGTGATCTGGACCAGTGGTGTGACCGACTATAACAGCGCACTGAT
 GGGCCGCGTGACCATCTCGGTAGACACGTGCGAAAAACAGTTCAGCC
 TGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCGGATACCGCTGTTTATTACTGC
 GCACGCGACGGGGATTATGATCGCTACACCATGGATTATTGGGGCCA
 GGGTACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (NO ID SEC:18)

10 *h7E6 SVG cadena variable de cadena ligera*

GATATCGTAATGACCCAATCTCCGGATTTCGCTGGCGGTATCACTGGGC
 GAACGTGCCACGATTAAGTCCGTGCAAGCAAATCAGTGTGACCTCC
 GGCTACAGCTATATGCACTGGTATCAACAGAAACCGGGCCAGCCGCC
 GAAACTGCTGATCTATCTGGCTAGCAACCTGGAGAGCGGTGTGCCTG
 15 ATCGCTTTAGTGGCTCCGGTAGCGGTACCGATTTACGCTGACCATCA
 GCTCCCTGCAGGCAGAAGACGTGGCCGTGTATTATTGTCAGCACAGC
 CGTGAGCTGCCGTATACTTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAAATCAAA
 (NO ID SEC:16)

En otras modalidades, la composición comprende cualquiera o
 20 ambos polinucleótidos mostrados en NO ID SEC: 18 y NO ID SEC: 19
 a continuación:

h7E6 SVGL región variable de cadena pesada

CAGGTCCAAGTGCAGGAATCAGGTCCAGGCCTGGTGAAACCGTCTGA
 AACCTGAGCCTGACATGCACCGTGAGCGGTGGTAGTATTAGCTCTTA
 25 CGCGTCCATTGGATCCGTCAACCGCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGATT
 GCGTGATCTGGACCAGTGGTGTGACCGACTATAACAGCGCACTGAT
 GGGCCGCGTGACCATCTCGGTAGACACGTGCGAAAAACAGTTCAGCC
 TGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCGGATACCGCTGTTTATTACTGC
 GCACGCGACGGGGATTATGATCGCTACACCATGGATTATTGGGGCCA
 30 GGGTACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (NO ID SEC:18)

h7E6 SVGL región variable de cadena ligera

GATATCGTAATGACCCAATCTCCGGATTTCGCTGGCGGTATCACTGGGC
 GAACGTGCCACGATTAAGTCCGTGCAAGCAAATCAGTGTGACCTCC
 TTGTACAGCTATATGCACTGGTATCAACAGAAACCGGGCCAGCCGCCG

AAACTGCTGATCTATCTGGCTAGCAACCTGGAGAGCGGTGTGCCTGAT
CGCTTTAGTGGCTCCGGTAGCGGTACCGATTTACGCTGACCATCAGC
TCCCTGCAGGCAGAAGACGTGGCCGTGTATTATTGTCAGCACAGCCG
TGAGCTGCCGTATACTTTTGGCCAGGGGACAAAACCTGGAAATCAAA

5 (NO ID SEC: 19).

En otras modalidades más, la composición comprende cualquiera o ambos polinucleótidos mostrados en NO ID SEC: 18 y NO ID SEC: 20 a continuación:

h7E6 SVGN región variable de cadena pesada

10 CAGGTCCAACTGCAGGAATCAGGTCCAGGCCTGGTGAAACCGTCTGA
AACCCTGAGCCTGACATGCACCGTGAGCGGTGGTAGTATTAGCTCTTA
CGCGTCCATTGGATCCGTCAACCGCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGATT
GGCGTGATCTGGACCAGTGGTGTGACCGACTATAACAGCGCACTGAT
GGGCCGCGTGACCATCTCGGTAGACACGTCGAAAAACAGTTCAGCC
15 TGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCGGATACCGCTGTTTATTACTGC
GCACGCGACGGGGATTATGATCGCTACACCATGGATTATTGGGGCCA
GGGTACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (NO ID SEC: 18)

h7E6 SVGN región variable de cadena ligera

GATATCGTAATGACCCAATCTCCGGATTTCGCTGGCGGTATCACTGGGC
20 GAACGTGCCACGATTAACTGCCGTGCAAGCAAATCAGTGTGACCTCC
AATTACAGCTATATGCACTGGTATCAACAGAAACCGGGCCAGCCGCCG
AAACTGCTGATCTATCTGGCTAGCAACCTGGAGAGCGGTGTGCCTGAT
CGCTTTAGTGGCTCCGGTAGCGGTACCGATTTACGCTGACCATCAGC
TCCCTGCAGGCAGAAGACGTGGCCGTGTATTATTGTCAGCACAGCCG
25 TGAGCTGCCGTATACTTTTGGCCAGGGGACAAAACCTGGAAATCAAA
(NO ID SEC: 20)

En otras modalidades, la composición comprende cualquiera o ambos polinucleótidos mostrados en NO ID SEC: 25 y NO ID SEC: 20 a continuación:

30 *h6G11 FKG SF región variable de cadena pesada*

CAGGTGCAGTTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTCAAGAAACCCGGCG
CCTCCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTACACCTTCACCAGT
TATTGGATTAACCTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCCAGGGGCTGGAGT
GGATGGGAAACATCTTCCCATCTGACTCTTACAGCAACTATAATAAGA

AATTTAAGGATCGCGTAACAATGACCCGTGACACCAGCACCAGCACT
GTTTACATGGAGCTGAGTTCTCTGCGTTCTGAAGATACCGCCGTGTAC
TACTGCGCACGCGGTTCCGGGTTTCGATTACTGGGGCCAGGGGACCC
TGGTCACCGTCTCCTCA (NO ID SEC:25)

5 *h6G11 FKG SF región variable de cadena ligera*

GAGATCGTGCTGACCCAAAGTCCAGCCACCCTTTCCCTGTCTCCAGGC
GAACGCGCAACCCTGAGCTGCCGCGCTTCTCAGACCATTGGTACCTC
CATTATTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAAGCCCCGCGTCTGCTGA
TCTATTACGCCTCAGAAAGTATTTTCAGGCATCCCCGCTCGCTTCTCCG
10 GCTCCGGCAGCGGAACCGACTTCACACTTACAATCTCTAGTTTGGAGC
CAGAAGACTTCGCCGTTTACTACTGTTTCGCAGTCTTTTAGCTGGCCAT
TTACCTTTGGCCAGGGCACGAAGCTGGAAATCAAG (NO ID SEC:26)

En otras modalidades, la composición comprende cualquiera o
ambos polinucleótidos mostrados en NO ID SEC: 22 y NO ID SEC: 21
15 a continuación:

m6G11 región variable de cadena pesada

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGG
CTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCT
ACTGGATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGG
20 ATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATTCTAACTACAATCAAAAGT
TCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCC
TACATGCAGGTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTA
CTGTACGTACGGTAGTAGCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGG
TCACCGTCTCCTCA (NO ID SEC:22)

25 *m6G11 región variable de cadena ligera*

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGG
AGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGACCATTGGCACAA
GCATACACTGGTATCAGCAAAGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCA
TAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGTG
30 GCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGT
CTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCAT
TCACGTTCCGGCTCGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (NO ID SEC:21)

En otras modalidades, la composición comprende cualquiera o
ambos polinucleótidos mostrados en NO ID SEC: 24 y NO ID SEC:

23 a continuación:

h6G11 región variable de cadena pesada

CAGGTGCAGTTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTCAAGAAACCCGGCG
 CCTCCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTACACCTTCACCACT
 5 TATTGGATTAAGTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCCAGGGGCTGGAGT
 GGATGGGAAACATCTACCCATCTGACTCTTACAGCAACTATAATCAGA
 AATTTAAGGATCGCGTAACAATGACCCGTGACACCAGCACCAGCACT
 GTTTACATGGAGCTGAGTTCTCTGCGTTCTGAAGATACCGCCGTGTAC
 TACTGCGCACGCGGTTCCAGTTTCGATTACTGGGGGCCAGGGGACCCT
 10 GGTCACCGTCTCCTCA (NO ID SEC: 24)

h6G11 región variable de cadena ligera

GAGATCGTGCTGACCCAAAGTCCAGCCACCCTTTCCCTGTCTCCAGGC
 GAACGCGCAACCCTGAGCTGCCGCGCTTCTCAGACCATTGGTACCTC
 CATTCAATTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAAGCCCCGCGTCTGCTGA
 15 TCTATTACGCCTCAGAAAGTATTTTCAGGCATCCCCGCTCGCTTCTCCG
 GCTCCGGCAGCGGAACCGACTTCACACTTACAATCTCTAGTTTGGAGC
 CAGAAGACTTCGCCGTTTACTACTGTCAGCAGTCTAACAGCTGGCCAT
 TTACCTTTGGCCAGGGCACGAAGCTGGAAATCAAG (NO ID SEC: 23).

Los vectores de expresión, y la administración de las
 20 composiciones de polinucleótido se describen de manera
 adicional en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para
 elaborar cualquiera de los polinucleótidos aquí descritos.

Los polinucleótidos complementarios para cualquiera de
 25 las secuencias también están considerados por la presente
 invención. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios
 (codificación o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser
 moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las
 moléculas de ARN incluyen moléculas HnARN, las cuales
 30 contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de
 una manera de uno a uno, y moléculas de ARNm, las cuales no
 contienen intrones. Las secuencias de codificación o sin
 codificación adicionales, pueden, no necesariamente, estar
 presentes dentro de un polinucleótido de la presente invención,

y un polinucleótido puede, aunque no de modo necesario, estar enlazado a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una porción del mismo) o puede comprender una variante de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótido contienen una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones y/o inserciones de modo que no se reduce la inmunoreactividad del polipéptido codificado, con relación a una molécula inmunoreactiva nativa. El efecto sobre la inmunoreactividad del polipéptido codificado puede ser evaluado de manera general como se describe en la presente. Las variantes exhiben de manera preferible por lo menos aproximadamente 70% de identidad, de mayor preferencia, por lo menos aproximadamente 80% de identidad, aún de modo más preferible, por lo menos aproximadamente 90% de identidad, y de la forma más preferible, por lo menos aproximadamente 95% de identidad para una secuencia de polinucleótido que codifica un anticuerpo nativo o una porción del mismo.

Se dice que dos secuencias de polinucleótido o polipéptido son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para correspondencia máxima como se describe más adelante. Las comparaciones entre dos secuencias se efectúan de modo común mediante comparación de las secuencias en una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" como se utiliza en la presente, se refiere a un segmento de por lo menos de aproximadamente 20 posiciones contiguas, de manera usual 30 hasta aproximadamente 75, o 40 hasta aproximadamente 50, en la cual una secuencia puede ser comparada para una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias son alineadas de manera óptima.

La alineación óptima de secuencias para comparación se puede conducir utilizando el programa Megalign en paquete integrado de

software bioinformático Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), utilizando parámetros predeterminados. Este programa presenta varios esquemas de alineación descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., 1983, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 80:726-730.

De preferencia, el "porcentaje de identidad de secuencia" es determinado mediante comparación de dos secuencias alineadas de manera optima en una ventana de comparación de por lo menos 20 posiciones, en donde la porción de la secuencia de polinucleótido o polipéptido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, espacios) de 20 por ciento o menos, usualmente de 5 hasta 15 por ciento, o 10 hasta 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o eliminaciones) para alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje es calculado mediante la determinación del número de posiciones en las cuales las bases de ácido nucléico idénticas o residuos de aminoácido se presentan en ambas secuencias para producir el número de posiciones acopladas, dividiendo el número de posiciones acopladas entre el número total en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de

ventana) y multiplicando los resultados por 100 para generar el porcentaje de identidad de secuencia.

Las variantes pueden también, o de manera alternativa, ser sustancialmente homólogos para un gen nativo, o una porción o
5 complemento del mismo. Dichas variantes de polinucleótido son susceptibles a hibridación bajo condiciones moderadamente rigurosas para una secuencia de ADN de presencia natural que codifica un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

Las "condiciones moderadamente rigurosas" adecuadas
10 incluyen prelavado en una solución de 5 X SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0); hibridizar a 50°C-65°C, 5 X SSC, durante la noche; seguido por lavado en dos ocasiones a 65°C durante 20 minutos con cada uno de 2X, 0.5X y 0.2X SSC que contienen 0.1 % SDS.

Como se utiliza en la presente, "condiciones altamente
15 rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y elevada temperatura para el lavado, por ejemplo 0.015 M cloruro de sodio/0.0015 M citrato de sodio/0.1% dodecil sulfato de sodio a 50°C; (2) emplear durante la hibridación un agente de desnaturalización, tal como formamida, por ejemplo,
20 50% (v/v) formamida con albúmina de suero bovino al 0.1%/0.1 % Ficoll/0.1% polivinilpirrolidona/50 mM solución reguladora de pH de fosfato de sodio a pH 6.5 con 750 mM cloruro de sodio, 75 mM citrato de sodio a 42°C; o (3) emplear 50% formamida, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M citrato de sodio), 50 mM fosfato de sodio (pH 6.8),
25 0.1% pirofosfato de sodio, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), 0.1 SDS, y 10% dextran sulfato a 42°C, con lavados a 42°C en 0.2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y 50% formamida a 55°C, seguida por un lavado de alta rigurosidad que consta de 0.1 x SSC que contiene
30 EDTA a 55°C. El técnico experimentado reconocerá como ajustar la temperatura, fuerza iónica, etcétera, según sea necesario para acomodar los factores tales como longitud de sonda y similares.

Aquellos con experiencia en la técnica apreciarán que, como un resultado de la degeneración del código genético, hay muchas

secuencias de nucleótido que codifican un polipéptido como se describe en la presente. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima para la secuencia de nucleótido de cualquier gen nativo. Sin embargo, los polinucleótidos que
5 varían debido a las diferencias en el uso de codón están específicamente considerados por la presente invención. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótido proporcionadas aquí están dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes
10 endógenos que son alterados como un resultado de una o más mutaciones, tales como eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm resultante y la proteína pueden tener, aunque no de manera necesaria, una estructura o función alterada. Los alelos pueden ser identificados utilizando
15 técnicas estándar (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencia de base de datos).

Los polinucleótidos de esta invención se pueden obtener utilizando síntesis química, métodos recombinantes, o PCR. Los métodos de síntesis de polinucleótido químicos son bien
20 conocidos en la técnica y no es necesario describirlos en detalle aquí. Alguien con experiencia en la técnica puede utilizar las secuencias aquí proporcionadas y un sintetizador de ADN comercial a fin de producir una secuencia de ADN deseada.

25 Para preparar polinucleótidos usando métodos recombinantes, un polinucleótido que comprende una secuencia deseada puede ser insertado dentro de un vector adecuado, y el vector a su vez puede ser introducido dentro de una célula huésped apropiada para replicación y amplificación, como se
30 describe de forma adicional en la presente. Los polinucleótidos pueden ser insertados en células huésped a través de medios conocidos en la técnica. Las células son transformadas mediante la introducción de un polinucleótido exógeno mediante absorción directa, endocitosis, transfección,

acoplamiento-F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno puede ser mantenido dentro de la célula como un vector no-integrado (tal como un plásmido) o integrado dentro del genoma de célula huésped. El polinucleótido así
5 amplificado puede ser aislado desde la célula huésped a través los métodos bien conocidos dentro de la técnica. Véase por ejemplo, Sambrook et al., 1989.

De manera alternativa, la PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología PCR es bien conocida en la
10 técnica y está descrita en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,683,195, 4,800,159, 4,754,065 y 4,683,202, así como PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauswer Press, Boston, 1994.

El ARN se puede obtener utilizando el ADN aislado en un
15 vector apropiado e insertarlo dentro de una célula huésped adecuada. Cuando los replicados celulares y el ADN es transcrito dentro del ARN, el ARN puede ser aislado después utilizando métodos bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica, como se establece en Sambrook et al., 1989, supra, por ejemplo.

20 Los vectores de clonación adecuados pueden ser contruidos de acuerdo con las técnicas estándar, o puede ser seleccionado a partir de un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. En tanto que el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped que se pretende utilizar, los
25 vectores de clonación útiles generalmente tendrán la habilidad de auto-replicarse, puede poseer un objetivo individual para una endonucleasa de restricción particular, y/o puede transportar genes para un marcador que puede ser utilizado en la selección de clones que contienen el vector. Los ejemplos adecuados incluyen plásmidos
30 y virus bacteriales, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADNs de fago, y vectores transportadores tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles a partir de proveedores comerciales tales como

BioRad, Strategene, e Invitrogen.

Los vectores de expresión generalmente son construcciones de polinucleótido replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la invención. Se implica que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuada incluyen aunque no se limitan a plásmidos, vectores virales, que incluyen adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus, cósmidos, y vector(es) de expresión descritos en Publicación PCT No. WO 87/04462. Los componentes de vector pueden incluir de manera general, aunque sin limitarse a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control transcripcional adecuados (tales como promotores, mejoradores y terminador). Para expresión (es decir, translación), uno o más elementos de control de traslación también son usualmente requeridos, tales como sitios de enlace de ribosoma, sitios de inicio de translación, y codones de finalización.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden ser introducidos dentro de la célula huésped a través de cualquier número de medios apropiados, que incluyen electroporación, transfección que emplea cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, u otras sustancias; bombardeo de microproyectil; lipofección; e infección (por ejemplo en donde el vector es un agente infeccioso tal como virus vaccinia). La elección de vectores de introducción o polinucleótidos dependerá con frecuencia de las características de la célula huésped.

La invención proporciona también células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente. Cualquiera de las células huéspedes capaces de sobre-expresar ADNs heterólogo pueden ser utilizados con la finalidad de aislar los genes que codifican el anticuerpo,

polipéptido o proteína de interés. Los ejemplos no-limitantes de células huéspedes de mamífero incluyen aunque no se limitan a células COS, HeLa, y CHO. Véase también la Publicación PCT No. WO 87/04462. Las células huéspedes no de mamífero incluyen

5 procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levadura (tal como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*). De preferencia, la célula huésped expresa los ADNc's en un nivel de aproximadamente 5 veces superior, de mayor preferencia, 10 veces mayor, incluso de mayor preferencia, 20 veces mayor que aquel del anticuerpo endógeno

10 correspondiente o proteína de interés, si está presente, en las células huéspedes. El análisis de células huéspedes para un enlace específico a Trop-2 o un dominio Trop-2 (por ejemplo, dominios 1-4) es efectuado por medio de un inmunoensayo o FACS. Se puede identificar una célula que sobreexpresa el anticuerpo o proteína de

15 interés.

Conjugados de anticuerpo Trop-2

La presente invención proporciona también un conjugado (o

20 inmunoconjugado) del anticuerpo Trop-2 como se describe en la presente, o del fragmento de enlace de antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno es conjugado para un agente (por ejemplo, un agente citotóxico) para inmunoterapia dirigida (por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco)

25 ya sea directamente o a través de un ligador. Por ejemplo, un agente citotóxico puede ser enlazado o conjugado para el anticuerpo Trop-2 o el fragmento de enlace de antígeno del mismo como se describe en la presente para suministro local dirigido de la porción de agente citotóxico para tumores (por ejemplo, el tumor que expresa Trop-2).

30 Los métodos para conjugar agente citotóxico u otros agentes terapéuticos para anticuerpos han sido descritos en varias publicaciones. Por ejemplo, la modificación química se puede hacer en los anticuerpos ya sea a través de aminos de cadena lateral de lisina o a través de grupos cisteína sulfhidrilo activados mediante la

reducción de enlaces disulfuro intercadena para que se presente la reacción de conjugación. Véase por ejemplo, Tanaka et al., FEBS Letters 579:2092-2096, 2005, and Gentle et al., Bioconjugate Chem. 15:658-663, 2004. Se han descrito
 5 también residuos de cisteína reactivos modificados genéticamente en sitios específicos de los anticuerpos para conjugación de fármaco específico con estequiometría definida. Véase por ejemplo, Junutula et al., Nature Biotechnology, 26:925-932, 2008. La conjugación que utiliza un marcador que
 10 contiene glutamina donador de acilo o una glutamina endógena hecha reactiva (por ejemplo, la habilidad para formar un enlace covalente como un donador acilo) mediante la modificación genética de polipéptido en presencia de transglutaminasa y una amina (por ejemplo, un agente citotóxico que comprende o está
 15 unido a una amina reactiva) se describe también en la Solicitud de Patente Internacional No. de Serie PCT/IB2011/054899 (WO2012/059882).

En ciertas modalidades, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la presente comprende un
 20 marcador que contiene glutamina donador de acilo modificado genéticamente en un sitio específico del anticuerpo (por ejemplo el extremo carboxilo, un extremo amino, o en otro sitio en el anticuerpo Trop-2). En ciertas modalidades, el marcador comprende un aminoácido glutamina (Q) o una
 25 secuencia aminoácido GLLQGG (NO ID SEC: 78), LLQGA (NO ID SEC: 79), o GLLQGA (NO ID SEC: 81) LLQ, LLQGPGK (NO ID SEC: 90), LLQGPG (NO ID SEC: 91), LLQGPA (NO ID SEC: 92), LLQGP (NO ID SEC: 93), LLQP (NO ID SEC: 94), LLQPGK (NO ID SEC: 95), LLQGAPGK (NO ID
 30 SEC: 96), LLQGAPG (NO ID SEC: 97), LLQGAP (NO ID SEC: 98), LLQX₁X₂X₃X₄X₅, en donde X₁ es G o P, en donde X₂ es A, G, P, o está ausente, en donde X₃ es A, G, K, P, o está ausente, en donde X₄ es K, G o está ausente, y en donde X₅ es K o está ausente (NO ID SEC: 88), o LLQX₁X₂X₃X₄X₅, en

donde X_1 es cualquier aminoácido de presencia natural y en donde X_2 , X_3 , X_4 , y X_5 son aminoácidos de presencia natural o están ausentes (NO ID SEC: 89). En ciertas modalidades, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la presente comprende

5 un marcador que contiene glutamina donador de acilo modificado genéticamente en un sitio específico del anticuerpo, en donde el marcador comprende una secuencia aminoácido GLLQGG (NO ID SEC: 78) modificada genéticamente en el extremo carboxílico de cadena ligera del anticuerpo Trop-2. En ciertas modalidades, el

10 anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la presente comprende un marcador que contiene glutamina donador de acilo modificado genéticamente en un sitio específico del anticuerpo, en donde el marcador comprende una secuencia aminoácido GLLQGA (NO ID SEC: 81) modificada genéticamente en el extremo carboxilo

15 de cadena ligera del anticuerpo Trop-2. En otras modalidades, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la presente comprende un marcador que contiene glutamina donador de acilo modificado genéticamente en un sitio específico del anticuerpo, en donde el marcador comprende una secuencia aminoácido LLQGA

20 (NO ID SEC: 79) modificada genéticamente en el extremo carboxilo de cadena pesada del anticuerpo Trop-2 y en donde el residuo lisina en el extremo carboxilo de cadena pesada es eliminado. En otras modalidades, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la presente comprende un marcador que contiene

25 glutamina donador de acilo modificado genéticamente en un sitio específico del anticuerpo, en donde el marcador comprende una secuencia aminoácido LLQ modificada genéticamente en el extremo carboxilo del anticuerpo Trop-2 y en donde el residuo lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada es eliminado. En ciertas

30 modalidades, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la presente comprende una sustitución aminoácido a partir de asparagina (N) para glutamina (Q) en la posición 297 del anticuerpo Trop-2.

Se proporciona también un anticuerpo aislado que comprende

un marcador que contiene glutamina donador de acilo y una modificación aminoácido en la posición 222, 340, o 370 del anticuerpo (esquema de numeración de Kabat), en donde la modificación es una eliminación, inserción, sustitución, mutación de aminoácido o cualquier combinación de las mismas. En consecuencia, en ciertas modalidades, se proporciona el anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la presente que comprende el marcador que contiene glutamina donador de acilo (por ejemplo, Q, GLLQGG (NO ID SEC: 78), LLQGA (NO ID SEC: 79), o GLLQGA (NO ID SEC: 81) LLQ, LLQGPGK (NO ID SEC: 90), LLQGPG (NO ID SEC: 91), LLQGPA (NO ID SEC: 92), LLQGP (NO ID SEC: 93), LLQP (NO ID SEC: 94), LLQPGK (NO ID SEC: 95), LLQGAPGK (NO ID SEC: 96), LLQGAPG (NO ID SEC: 97), LLQGAP (NO ID SEC: 98), LLQX₁X₂X₃X₄X₅, en donde X₁ es G o P, en donde X₂ es A, G, P, o está ausente, en donde X₃ es A, G, K, P, o está ausente, en donde X₄ es K, G o está ausente, y en donde X₅ es K o está ausente (NO ID SEC: 88), o LLQX₁X₂X₃X₄X₅, en donde X₁ es cualquier aminoácido de presencia natural y en donde X₂, X₃, X₄, y X₅ son cualesquiera aminoácidos de presencia natural o están ausentes (NO ID SEC: 89) conjugado en un sitio específico (por ejemplo, en un extremo carboxilo de la cadena pesada o la cadena ligera u otro sitio) del anticuerpo Trop-2 y una modificación aminoácido en la posición 222, 340, o 370 del anticuerpo (esquema de numeración de Kabat). En ciertas modalidades, la modificación aminoácido es una sustitución a partir de lisina a arginina (por ejemplo, K222R, K340R, o K370R). En ciertas modalidades, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la presente comprende un marcador que contiene glutamina donador de acilo que comprende la secuencia GLLQGG (NO ID SEC: 78) modificada genéticamente en el extremo C de la cadena ligera de anticuerpo Trop-2 y una sustitución aminoácido a partir de

lisina para arginina en la posición 222 del anticuerpo (esquema de numeración de Kabat). En ciertas modalidades, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la presente comprende un marcador que contiene glutamina donador de acilo que comprende la secuencia GLLQGA (NO ID SEC: 81) modificada genéticamente en el extremo C de la cadena ligera de anticuerpo Trop-2 y una sustitución aminoácido a partir de lisina para arginina en la posición 222 del anticuerpo (esquema de numeración de Kabat). En ciertas modalidades, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la presente comprende un marcador que contiene glutamina donador de acilo que contiene la secuencia LLQGA (NO ID SEC: 79) modificada genéticamente en el extremo C de la cadena pesada de anticuerpo Trop-2 y una sustitución aminoácido a partir de lisina para arginina en la posición 222 del anticuerpo (esquema de numeración de Kabat) en donde el residuo lisina en el extremo carboxilo de cadena pesada es eliminado. En ciertas modalidades, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la presente comprende un marcador que contiene glutamina donador de acilo que comprende la secuencia LLQ modificada genéticamente en el extremo C de la cadena pesada de anticuerpo Trop-2 y una sustitución aminoácido a partir de lisina para arginina en la posición 222 del anticuerpo (esquema de numeración de Kabat), en donde el residuo lisina en el extremo carboxilo de cadena pesada es eliminado. En cierta modalidad, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado como se describe en la presente comprende un marcador que contiene glutamina donador de acilo que contiene una glutamina modificada genéticamente en la posición 297 del anticuerpo Trop-2 y una sustitución aminoácido a partir de lisina para arginina en la posición 222 del anticuerpo (esquema de numeración de Kabat).

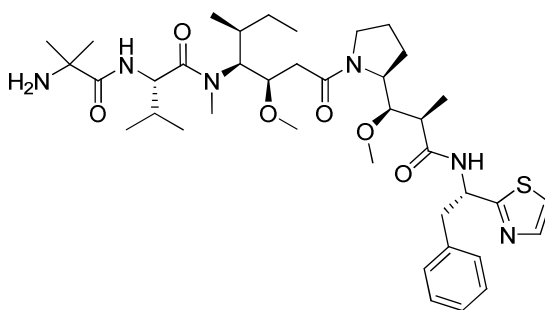
Los agentes que pueden ser conjugados para los anticuerpos Trop-2 o los fragmentos de enlace de antígeno de la presente invención incluyen, aunque no se limitan a, agentes citotóxicos, agentes inmunomoduladores, agentes trazadores para diagnóstico por imágenes, proteínas terapéuticas, biopolímeros, u

oligonucleótidos.

Los ejemplos de un agente citotóxico incluyen, aunque no se limitan a, una antraciclina, una auristatina, una dolastatina, CC-1065, una duocarmicina, un enodiíno, una geldanamicina, una maitansina, una puromicina, un taxano, un vinca alquilóide, SN-38, tubulisina, hemiasterlina, y estereoisómeros, isoésteres, análogos o derivados de los mismos.

Las antraciclinas son derivadas a partir de bacterias *Streptomyces* y han sido utilizadas para tratar un amplio rango de cánceres, tales como leucemias, linfomas, cáncer de mama, uterino, de ovario, y pulmonar. Las antraciclinas ilustrativas incluyen, aunque no se limitan a, daunorubicina, doxorubicina (por ejemplo, adriamicina), epirubicina, idarubicina, valrubicina, y mitoxantrona.

Las dolastatinas y sus análogos peptídicos y derivados, auristatinas, son agentes antimitóticos de alta potencia de los que se ha demostrado que poseen actividad anticancerígena y antifungal. Véase por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,663,149 y Pettit et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965, 1998. Las dolastatinas y auristatinas ilustrativas incluyen, aunque no se limitan a, dolastatina 10, auristatina E, auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), MMAD (Monometil Auristatina D o monometil dolastatina 10), MMAF (Monometil Auristatina F o N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproina-fenilalanina), MMAE (Monometil Auristatina E o N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproina-norefedrina), y éster de ácido-AE 5-benzoilvalérico (AEVB), y otros derivados de auristatina (tales como aquellos descritos en la Solicitud de los Estados Unidos No. 61/561,255 y 61/676,423). En ciertas modalidades, la auristatina es 0101 (2-metilalanil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1*S*)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:



La duocarmicina y CC-1065 son agentes alquilantes de ADN
 5 con potencia citotóxica. Véase Boger y Johnson, *PNAS* 92:3642-3649, 1995. Las dolastatinas y auristatinas ilustrativas incluyen, aunque no se limitan a, (+)-docarmicina A y (+)-duocarmicina SA, y (+)-CC-1065.

Los enodifinos son una clase de productos bacteriales anti-
 10 tumorales caracterizados por anillos de nueve y diez miembros o la presencia de un sistema cíclico de enlaces triple-doble-triple conjugados. Los enodifinos ilustrativos incluyen, aunque no se limitan a, calicheamicina, esperamicina, y dinemicina.

Las geldanamicinas son antibióticos de benzoquinona
 15 ansamicina que se enlazan a Hsp90 (Heat 30 Shock Protein 90) y han sido utilizadas como fármacos anti-tumorales. Las geldanamicinas ilustrativas incluyen, aunque no se limitan a, 17-AAG (17-N-Alilamino-17-Demetoxigeldanamicina) y 17-DMAG (17-Dimetilaminetilamino-17-demetoxigeldanamicina).

Las maitansinas o sus maitansinoides derivados inhiben la
 20 proliferación celular al inhibir la formación de microtubulos durante la mitosis a través de la inhibición de polimerización de tubulina. Véase Rennillard et al., *Science* 189:1002-1005, 1975. Las maitansinas y maitansinoides ilustrativos incluyen, aunque no se
 25 limitan a, mertansina (DM1) y sus derivados así como ansamitocina.

Los taxanos son diterpenos que actúan como agentes anti-
 tubulina o inhibidores mitóticos. Los taxanos ilustrativos incluyen, aunque no se limitan a, paclitaxel (por ejemplo, TAXOL®) y docetaxel

(TAXOTERE®).

Los vinca alquiloides son también agentes anti-tubulina. Los vinca alquiloides ilustrativos incluyen, aunque no se limitan a, vincristina, vinblastina, vindesina, y vinorelbina.

5 En ciertas modalidades, el agente es un agente inmunomodulador. Los ejemplos de un agente inmunomodulador incluyen, aunque no se limitan a, ganciclovir, etanercept, tacrolimus, sirolimus, voclosporina, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetil,
10 metotrexato, glucocorticoide y sus análogos, citocinas, factores de crecimiento de célula madre, linfoquinas, factor de necrosis tumoral (TNF), factores hematopoyéticos, interleucinas (por ejemplo, interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, e IL-21), factores de estimulación de colonia (por
15 ejemplo, factor de estimulación de colonia-granulocito (G-CSF) y factor de estimulación de colonia-macrófago granulocito (GM-CSF)), interferones (por ejemplo, interferones- α , β - e γ), el factor de crecimiento de célula madre designado "factor S 1", eritropoietina y trombopoietina, o una combinación de los
20 mismos.

En ciertas modalidades, el agente es un agente trazador para diagnóstico por imágenes (por ejemplo, un fluoróforo o un marcador PET (Tomografía de Emisión de Positrones) o
25 marcador SPECT (Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único), o marcador MRI (Diagnóstico por Imágenes de Resonancia Magnética).

Ejemplos de fluoróforos incluyen, aunque no se limitan a, fluorescein isotiocianato (FITC) (por ejemplo, 5-FITC), fluorescein amidita (FAM) (por ejemplo, 5-FAM), eosina,
30 carboxifluoresceína, eritrosina, Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 647, 660, 680, 700, o 750), carboxitetrametilrodamina (TAMRA) (por ejemplo, 5-TAMRA), tetrametilrodamina (TMR), y sulforodamina (SR) (por ejemplo, SR101).

En ciertas modalidades, los radioisótopos terapéuticos o de diagnóstico u otros marcadores (por ejemplo, marcadores PET o SPECT) pueden ser incorporados en el agente para conjugación a los anticuerpos Trop-2 o los fragmentos de enlace de antígeno como se describe en la presente. Los ejemplos de un radioisótopo u otras etiquetas incluyen, aunque no se limitan a, ^3H , ^{11}C , ^{13}N , ^{14}C , ^{15}N , ^{15}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Se , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{94}Tc , ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{99}Tc , ^{103}Ru , ^{105}Rh , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{113}In , ^{121}Te , ^{122}Te , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{125}Te , ^{126}I , ^{131}I , ^{131}In , ^{133}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{153}Pb , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{165}Tm , ^{166}Dy , ^{166}H , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{169}Yb , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{197}Pt , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{201}Tl , ^{203}Hg , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{224}Ac , y ^{225}Ac .

En ciertas modalidades, el agente es una proteína terapéutica que incluye, aunque sin limitarse a, una toxina, una hormona, una enzima, y un factor de crecimiento.

Los ejemplos de una proteína de toxina (o polipéptido) incluyen, aunque no se limitan a, difteria (por ejemplo, cadena A de difteria), exotoxina y endotoxina de *Pseudomonas*, ricina (por ejemplo, cadena de ricina A), abrina (por ejemplo, cadena de abrina A), modeccina (por ejemplo cadena A de modeccina), alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina-A *Staphylococcal*, proteína antiviral “pokeweed”, gelonina, difterin toxina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia (balsamino), curcina, crotina, inhibidor de saponaria (sapaonaria officinalis), mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, tricotecenos, péptidos inhibidores de puente de cistina (ICK) (por ejemplo, ceratotoxinas), y conotoxina (por ejemplo, KIIIA o SmIIIA).

En ciertas modalidades, el agente es un polímero biocompatible. Los anticuerpos Trop-2 o los fragmentos de enlace de antígeno como se describen en la presente pueden ser conjugados para el polímero biocompatible a fin de incrementar la vida media en suero y la bioactividad, y/o extender las vida media *in vivo*. Los

ejemplos de polímeros biocompatibles incluyen polímero soluble en agua, tal como polietilen glicol (PEG) o sus derivados de los mismos y polímeros biocompatibles que contienen zwitterion (por ejemplo, un polímero que contiene fosforilcolina).

En ciertas modalidades, el agente es un oligonucleótido, tales como oligonucleótidos anti-sentido.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado del anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno como se describe aquí, en donde el conjugado comprende la fórmula: anticuerpo-(marcador que contiene glutamina donador de acilo)-(ligador)-(agente citotóxico), en donde el marcador que contiene glutamina donador de acilo es modificado genéticamente en un sitio específico del anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno (por ejemplo, en un extremo carboxilo de la cadena pesada o ligera o en otro sitio), en donde el marcador es conjugado para un ligador (por ejemplo un ligador que contiene una o más aminos reactivas (por ejemplo, amina primaria NH_2)), y en donde el ligador es conjugado para un agente citotóxico (por ejemplo, MMAD u otras auristatinas tales como 0101).

Los ejemplos de un ligador que contiene una o más aminos reactivas incluyen, aunque no se limitan a, acetil-lisina-valina-citrulina-*p*-aminobenciloxicarbonilo (AcLys-VC-PABC) o amino PEG6-propionilo. Véase por ejemplo, WO2012/059882.

En ciertas modalidades, el marcador que contiene glutamina donador de acilo comprende GLLQGG (NO ID SEC: 78), LLQGA (NO ID SEC:79), GLLQGA (NO ID SEC:81), LLQ, LLQGPGK (NO ID SEC: 90), LLQGPG (NO ID SEC: 91), LLQGPA (NO ID SEC: 92), LLQGP (NO ID SEC: 93), LLQP (NO ID SEC: 94), LLQPGK (NO ID SEC: 95), LLQGAPGK (NO ID SEC: 96), LLQGAPG (NO ID SEC: 97), LLQGAP (NO ID SEC: 98), $\text{LLQX}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{X}_5$, en donde X_1 es G o P, en donde X_2 es A, G, P, o está ausente, en donde X_3 es A, G, K, P, o está

ausente, en donde X_4 es K, G o está ausente, y en donde X_5 es K o está ausente (NO ID SEC: 88), o $LLQX_1X_2X_3X_4X_5$, en donde X_1 es cualquier aminoácido de presencia natural y en donde X_2 , X_3 , X_4 , and X_5 son cualesquiera aminoácidos de presencia natural o están ausentes (NO ID SEC: 89).

En ciertas modalidades, el conjugado es 1) anticuerpo-LLQGA (NO ID SEC: 79)- AcLys-VC-PABC-0101; 2) anticuerpo-LLQGA (NO ID SEC: 79)-AcLys-VC-PABC-MMAD; 3) anticuerpo- $LLQX_1X_2X_3X_4X_5$ (NO ID SEC: 88)-AcLys-VC-PABC-0101; 4) anticuerpo- $LLQX_1X_2X_3X_4X_5$ (NO ID SEC: 88)-AcLys-VC-PABC-MMAD; 5) anticuerpo-GGLLQGG (NO ID SEC: 78)-AcLys-VC-PABC-0101; y 6) anticuerpo-GGLLQGG (NO ID SEC: 78)- AcLys-VC-PABC-MMAD. En ciertas modalidades, el marcador que contiene glutamina donador de acilo que comprende, por ejemplo, LLQ, NO ID SEC: 79, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, o 98, es modificado genéticamente en el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo, en donde el residuo lisina en el extremo C es eliminado. En otras modalidades, el marcador que contiene glutamina donador de acilo (por ejemplo, GGLLQGG (NO ID SEC: 78)) es modificado genéticamente en el extremo C de la cadena ligera del anticuerpo. Los ejemplos del anticuerpo incluyen, aunque no se limitan a, h7E6_SVG, h7E6_SVG1, h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, and h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6, h7E6_SVG7, h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11, h7E6_SVG12, h7E6_SVG13, h7E6_SVG14, h7E6_SVG15, h7E6_SVG16, h7E6_SVG17, h7E6_SVG18, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23, h7E6_SVG24, h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27, h7E6_SVG28, h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31, h7E6_SVG32, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h7E6SVGN, h6G11, o h6G11_FKG_SF.

En una variación, el conjugado comprende además una sustitución aminoácido a partir de lisina para arginina en la posición 222. En consecuencia, por ejemplo, el conjugado es 1) anticuerpo GGLLQGG (NO ID SEC: 78)-AcLys-VC-PABC-MMAD y comprende

K222R; 2) anticuerpo-GGLLQGG (NO ID SEC: 78)-AcLys-VC-PABC-0101 y comprende K222R; 3) anticuerpo-LLQGA (NO ID SEC: 79)-AcLys-VC-PABC-0101 y comprende K222R; 4) anticuerpo-LLQGA (NO ID SEC: 79)-AcLys-VC-PABC-MMAD y comprende K222R; y 5) anticuerpo-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (NO ID SEC: 88)-AcLys-VC-PABC-MMAD y comprende K222R. En ciertas modalidades, el marcador que contiene glutamina donador de acilo que comprende, por ejemplo, LLQ, NO ID SEC: 79, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, o 98, es modificado genéticamente en el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo, en donde el residuo lisina en el extremo C es eliminado. En otras modalidades, el marcador que contiene glutamina donador de acilo (por ejemplo, GGLLQGG (NO ID SEC: 78)) es modificado genéticamente en el extremo C de la cadena ligera del anticuerpo. Los ejemplos del anticuerpo incluyen, aunque sin limitarse a, h7E6_SVG, h7E6_SVG1, h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, and h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6, h7E6_SVG7, h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11, h7E6_SVG12, h7E6_SVG13, h7E6_SVG14, h7E6_SVG15, h7E6_SVG16, h7E6_SVG17, h7E6_SVG18, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20, h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23, h7E6_SVG24, h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27, h7E6_SVG28, h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31, h7E6_SVG32, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h6G11, o h6G11_FKG_SF.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado del anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno como se describe en la presente, el conjugado comprende sustituciones aminoácido en las posiciones N297Q y K222R, un ligador que comprende amino-PEG6-propionilo, y un agente citotóxico (por ejemplo, MMAD u otras auristatinas). Por ejemplo, el conjugado es h7E6_SVG, h7E6_SVG1, h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6, h7E6_SVG7,

h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11, h7E6_SVG12,
h7E6_SVG13, h7E6_SVG14, h7E6_SVG15, h7E6_SVG16,
h7E6_SVG17, h7E6_SVG18, h7E6_SVG19, h7E6_SVG20,
h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23, h7E6_SVG24,
5 h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27, h7E6_SVG28,
h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31, h7E6_SVG32,
h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2, h7E6_SVGL3,
h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h6G11, o h6G11_FKG_SF que conjuga
para amino-PEG6-propionilo y MMAD o h7E6_SVG, h7E6_SVG1,
10 h7E6_SVG2, h7E6_SVG3, h7E6_SVG4, h7E6_SVG5, h7E6_SVG6,
h7E6_SVG7, h7E6_SVG8, h7E6_SVG9, h7E6_SVG10, h7E6_SVG11,
h7E6_SVG12, h7E6_SVG13, h7E6_SVG14, h7E6_SVG15,
h7E6_SVG16, h7E6_SVG17, h7E6_SVG18, h7E6_SVG19,
h7E6_SVG20, h7E6_SVG21, h7E6_SVG22, h7E6_SVG23,
15 h7E6_SVG24, h7E6_SVG25, h7E6_SVG26, h7E6_SVG27,
h7E6_SVG28, h7E6_SVG29, h7E6_SVG30, h7E6_SVG31,
h7E6_SVG32, h7E6_SVGL, h7E6_SVGL1, h7E6_SVGL2,
h7E6_SVGL3, h7E6_SVGL4, h7E6_SVGL5, h6G11, o h6G11_FKG_SF
que conjuga para amino-PEG6-propionilo y 0101.

20

Métodos de Uso de los Anticuerpos Trop-2 y los Conjugados de Anticuerpo de los Mismos

Los anticuerpos y los conjugados de anticuerpo de la presente
25 invención son útiles en varias aplicaciones que incluye, aunque no
se limitan a, métodos de tratamiento terapéuticos y métodos de
tratamiento de diagnóstico.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar
una condición asociada con la expresión de Trop-2 en un sujeto. En
30 ciertas modalidades, el método de tratamiento de una condición
asociada con expresión de Trop-2 en un sujeto comprende
administrar al sujeto que necesita del mismo una cantidad efectiva
de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que
comprende los anticuerpos Trop-2 o los conjugados de anticuerpo

Trop-2 como se describe en la presente. Las condiciones asociadas con la expresión de Trop-2 incluyen, aunque no se limitan a, expresión de Trop-2 anormal, expresión de Trop-2 alterada o aberrante, sobreexpresión de Trop-2, y un padecimiento proliferativo (por ejemplo, cáncer).

En consecuencia, en ciertas modalidades, se proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto que comprende administrar a un sujeto que necesita de la misma, una cantidad efectiva de una composición que comprende los anticuerpos Trop-2 o los conjugados de anticuerpo Trop-2 como se describen aquí. Como se utiliza en la presente, los cánceres incluyen, aunque no se limitan a cáncer de vejiga, de mama, cervical, coriocarcinoma, de colon, gástrico, glioblastoma, de cabeza y cuello, de riñón, pulmonar, de la boca, de ovarios, pancreático, de próstata, y de piel. En ciertas modalidades, se proporciona un método para inhibir el crecimiento o progresión de tumor en un sujeto que tiene un tumor que expresa Trop-2, que comprende administrar a un sujeto que necesita de la misma, una cantidad efectiva de una composición que comprende los anticuerpos Trop-2 o los conjugados de anticuerpo Trop-2 como se describe en la presente. En otras modalidades, se proporciona un método para inhibir metástasis de células cancerosas que expresan Trop-2 en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que necesita de la misma una cantidad efectiva de una composición que comprende los anticuerpos Trop-2 o los conjugados de anticuerpo Trop-2 como se describe en la presente. En otras modalidades, se proporciona un método para inducir la regresión de un tumor que expresa Trop-2 en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que necesita de la misma, una cantidad efectiva de una composición que comprende los anticuerpos Trop-2 o los conjugados de anticuerpo Trop-2 como se describe aquí.

En otro aspecto, se proporciona un método para detectar, diagnosticar y/o monitorear una condición asociada con la

expresión de Trop-2. Por ejemplo, los anticuerpos Trop-2 como se describen en la presente pueden ser marcados con una porción detectable tal como un agente trazador para diagnóstico por imágenes y un marcador de enzima-sustrato. Los anticuerpos como
5 se describen aquí también pueden ser utilizados para ensayos de diagnóstico *in vivo*, tal como diagnóstico por imágenes *in vivo* (por ejemplo, PET o SPECT), o un agente de tinción.

En ciertas modalidades, los métodos descritos en la presente comprenden además una etapa de tratar a un sujeto con una forma
10 adicional de terapia. En ciertas modalidades, la forma adicional de terapia es una terapia anti-cáncer adicional que incluye, aunque no se limita a, quimioterapia, radiación, cirugía, terapia de hormona, y/o inmunoterapia adicional.

En ciertas modalidades, la forma adicional de la terapia
15 comprende administrar uno o más agentes terapéuticos además de los anticuerpos Trop-2 o los conjugados de anticuerpo Trop-2 como se describe en la presente. Los agentes terapéuticos incluyen, aunque no se limitan a, un segundo anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, un anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-
20 CD25, y/o un anticuerpo anti-CD20), un inhibidor de angiogénesis, un agente citotóxico, un agente anti-inflamatorio (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel, cisplatina, doxorubicina, prednisona, mitomicina, progesterona, tamoxifen, o fluorouracilo).

El anticuerpo Trop-2 o los conjugados de anticuerpo Trop-2
25 pueden ser administrados a un individuo a través de cualquier ruta adecuada. Las personas con experiencia en la técnica comprenderán que los ejemplos descritos en la presente no están destinados a ser limitantes sino ilustrativos de las técnicas disponibles. En consecuencia, en ciertas modalidades, el anticuerpo Trop-2 o el
30 conjugado de anticuerpo Trop-2 es administrado a un individuo de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, un bolo o por medio de infusión continua durante un período, a través de rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, intracraneal, transdérmica, subcutánea, intra-

articular, sublingual, intrasynovial, a través de insuflación, intratecal, oral, inhalación o tópica. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, administración intravenosa, o localizada. Los nebulizadores comercialmente disponibles para formulaciones líquidas, que incluyen nebulizadores de chorro y nebulizadores ultrasónicos son útiles para la administración. Las formulaciones líquidas pueden ser nebulizadas directamente y el polvo liofilizado puede ser nebulizado después de la reconstitución. De manera alternativa, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado de anticuerpo Trop-2 puede ser suministrado en aerosol utilizando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida, o inhalado como un polvo liofilizado y molido.

En una modalidad, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado de anticuerpo Trop-2 es administrado a través de técnicas de suministro específicas de sitio o local dirigido. Los ejemplos de técnicas de suministro específico de sitio o local dirigido incluyen varias fuentes de depósito implantable del anticuerpo Trop-2 o el conjugado de anticuerpo Trop-2 o catéteres de suministro local, tales como catéteres de infusión, catéteres permanentes, o catéteres de aguja, injertos sintéticos, vendajes adventicios, derivaciones y endoprótesis u otros dispositivos implantables, vehículos específicos de sitio, inyección directa, o aplicación directa. Véase por ejemplo, Publicación PCT No. WO 00/53211 y Patente de los Estados Unidos No. 5,981,568.

Se pueden utilizar varias formulaciones del anticuerpo Trop-2 o el conjugado de anticuerpo Trop-2 para la administración. En ciertas modalidades, el anticuerpo Trop-2 o el conjugado de anticuerpo Trop-2 puede ser administrado en forma pura. En ciertas modalidades, el anticuerpo Trop-2 (o el conjugado de anticuerpo Trop-2) y un excipiente farmacéuticamente aceptable puede estar en varias formulaciones. Los excipientes farmacéuticamente aceptables

son conocidos en la técnica, y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente efectiva. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar como un diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, aunque no se limitan a agentes estabilizadores, agentes de humectación y emulsificación, sales para osmolaridad variable, agentes de encapsulado, soluciones reguladoras de pH, y mejoradores de penetración en la piel. Los excipientes así como las formulaciones para suministro de fármaco parenteral y no parenteral se establecen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000.

En ciertas modalidades, estos agentes son formulados para administración mediante inyección (por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etcétera). En consecuencia, estos agentes pueden ser combinados con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y similares. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, programación y repetición, dependerá del individuo particular y el historial médico de ese individuo.

Los anticuerpos de Trop-2 o los conjugados de anticuerpo Trop-2 como se describen en la presente pueden ser administrados utilizando cualquier método adecuado, que incluye mediante inyección (por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etcétera). El anticuerpo Trop-2 o el conjugado de anticuerpo Trop-2 puede ser administrado también a través de inhalación, como se describe aquí. En general, para la administración de un anticuerpo Trop-2 y un conjugado de anticuerpo Trop-2, una dosificación potencial inicial puede ser de aproximadamente 2 mg/kg. Para el propósito de la presente invención, una dosificación diaria común puede variar desde aproximadamente cualquiera de 3 µg/kg hasta 30 µg/kg hasta 300 µg/kg hasta 3 mg/kg, hasta 30 mg/kg, hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores antes mencionados. Por ejemplo, se

puede utilizar la dosificación de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2.5 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, y aproximadamente 25 mg/kg. Para administraciones repetidas durante varios días o más
5 dependiendo de la condición, el tratamiento es sostenido hasta que se presenta una supresión deseada de los síntomas o hasta que se alcanzan los niveles terapéuticos suficientes, por ejemplo, para inhibir o retrasar el crecimiento/progresión del tumor o metástasis de células cancerosas. Un régimen de
10 dosificación ilustrativo comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguida por una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo Trop-2 o conjugado de anticuerpo Trop-2, o seguida por una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg
15 cada dos semanas. Otro régimen de dosificación ilustrativo comprende administrar dosis crecientes (por ejemplo, dosis inicial de 1 mg/kg e incremento gradual a una o más dosis más elevadas semanalmente o un período mayor). Otros regímenes de dosificación también pueden ser útiles, dependiendo del
20 patrón de disminución farmacocinética que el practicante desee lograr. Por ejemplo, en ciertas modalidades, está considerada la dosificación desde una hasta cuatro veces por semana. En otras modalidades está contemplada la dosificación una vez al mes o una vez cada dos meses o cada tres meses. El progreso
25 de esta terapia es fácilmente monitoreado a través de técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (que incluye el anticuerpo Trop-2 o el conjugado de anticuerpo Trop-2 usado) puede variar con el transcurso del tiempo.

Para el propósito de la presente invención, la dosificación
30 apropiada de un anticuerpo Trop-2 o un conjugado de anticuerpo Trop-2 dependerá del anticuerpo Trop-2 o el conjugado de anticuerpo Trop-2 (o composiciones de los mismos) empleado, el tipo y severidad de los síntomas que se van a tratar, cualquiera que sea el agente administrado para

finés terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al agente, el índice de eliminación del paciente para el agente administrado, y la discreción del médico que atiende. De manera común, el médico administrará un anticuerpo Trop-2 o un
5 conjugado de anticuerpo Trop-2 hasta que se alcance una dosis que logra el resultado deseado. La dosis y/o frecuencia pueden variar durante el curso del tratamiento. Consideraciones empíricas, tal como la vida media, contribuirán en general a la determinación de la dosificación. Por ejemplo, los anticuerpos que son compatibles con
10 el sistema inmune humano, tales como los anticuerpos humanizados o anticuerpos completamente humanos, pueden ser utilizados a fin de prolongar la vida media del anticuerpo y para evitar que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmune del huésped. La frecuencia de administración se puede determinar y ajustar durante
15 el curso de la terapia, y se basa, en general, aunque no necesariamente, en el tratamiento y/o supresión y/o mejoría y/o retraso de los síntomas, por ejemplo, inhibición o retraso del crecimiento del tumor, etcétera. De modo alternativo, pueden ser apropiadas las formulaciones de liberación sostenida de anticuerpos
20 Trop-2 o conjugados de anticuerpo Trop-2. Se conocen varias formulaciones y dispositivos para lograr la liberación sostenida.

En una modalidad, las dosificaciones de un anticuerpo Trop-2 o un conjugado de anticuerpo Trop-2 pueden ser determinadas de forma empírica en individuos a los que se ha suministrado una o más
25 administraciones del anticuerpo Trop-2 o su conjugado de anticuerpo Trop-2. Se suministra a los individuos dosificaciones crecientes de un anticuerpo Trop-2 o un antagonista de Trop-2. Para determinar la eficacia, se puede dar seguimiento a un indicador de la enfermedad.

La administración de un anticuerpo Trop-2 o un conjugado de
30 anticuerpo Trop-2 de acuerdo con el método en la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la condición fisiológica del receptor, ya sea que el propósito de la administración sea terapéutico o profiláctico, y otros factores conocidos por los practicantes experimentados. La administración de

un anticuerpo Trop-2 o un conjugado de anticuerpo Trop-2 puede ser esencialmente continua durante un período seleccionado de manera previa o puede ser en una serie de dosis separadas.

5 En ciertas modalidades, puede estar presente más de un anticuerpo Trop-2 o conjugado de anticuerpo Trop-2. Pueden estar presentes por lo menos uno, al menos dos, por lo menos tres, al menos cuatro, por lo menos cinco o más anticuerpos Trop-2 o conjugados de anticuerpo Trop-2 diferentes. En
10 general, esos anticuerpos Trop-2 o conjugados de anticuerpo Trop-2 pueden tener actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Por ejemplo, uno o más del siguiente anticuerpo Trop-2 pueden ser utilizados: un
15 primer anticuerpo Trop-2 dirigido a un epítope en Trop-2 y un segundo anticuerpo Trop-2 dirigido a un epítope diferente en Trop-2.

 Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo Trop-2 o el conjugado de anticuerpo Trop-2 usados de acuerdo con la presente invención son preparadas para almacenamiento al
20 mezclar un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o
25 estabilizadores adecuados no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, y pueden comprender soluciones reguladoras de pH tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; sales como cloruro de sodio; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina;
30 conservadores (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos

de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o agentes tensioactivos no-iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilen glicol (PEG).

Los liposomas que contienen el anticuerpo Trop-2 o el conjugado de anticuerpo Trop-2 se preparan a través de métodos conocidos en la técnica, tales como aquellos descritos en Epstein, et al., Proc. Nati. Acad. Sci. USA 82:3688, 1985; Hwang, et al., Proc. Nati Acad. Sci. USA 77:4030, 1980; y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,485,045 y 4,544,545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5,013,556. Los liposomas de particular utilidad pueden ser generados a través del método de evaporación de fase inversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina PEG-derivada (PEG-PE). Los liposomas son extruidos a través de filtros de tamaño de poro definido a fin de producir liposomas con el diámetros deseado.

Los ingredientes activos también pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, a través de técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albumina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005.

Se pueden elaborar preparaciones de liberación sostenida. Los

ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en la forma de artículos formados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de los Estados Unidos No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT TM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprorrelina), isobutirato de acetato de sacarosa, y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones para ser utilizadas en la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones terapéuticas de anticuerpo Trop-2 o conjugado de anticuerpo Trop-2 generalmente son colocadas en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o envase de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por medio de una aguja de inyección hipodérmica.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden ser formas de dosificación unitarias como tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones, o supositorios, para administración oral, parenteral o rectal, o administración por medio de inhalación o insuflación.

Para preparar composiciones sólidas como las tabletas, el ingrediente activo principal es mezclado con un vehículo farmacéutico, por ejemplo ingredientes de formación de tabletas convencionales tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de

magnesio, fosfato dicálcico o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. Cuando se hace referencia a esas composiciones de preformulación como homogéneas, se representa que el ingrediente activo es dispersado uniformemente a través de la composición de modo que la composición puede ser fácilmente subdividida en formas de dosificación unitarias igualmente efectivas como tabletas, píldoras y cápsulas. Esta composición de preformulación sólida es subdividida después en formas de dosificación unitarias del tipo antes descrito que contienen desde 0.1 hasta aproximadamente 500 mg del ingrediente activo de la presente invención. Las tabletas o píldoras de la composición novedosa pueden ser recubiertas o de otro modo compuestas a fin de proporcionar una forma de dosificación que logra la ventaja de la acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o píldora puede comprender un componente de dosificación interna y un componente de dosificación externa, éste último que está en la forma de una cubierta sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto dentro del duodeno o se retrase su liberación. Se puede usar una variedad de materiales para dichas capas entéricas o recubrimientos, dichos materiales que incluyen un número de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Los agentes tensioactivos adecuados incluyen, en particular, agentes no iónicos, tales como polioxietilensorbitanes (por ejemplo, TweenTM 20, 40, 60, 80 u 85) y otros sorbitanes (por ejemplo, SpanTM 20, 40, 60, 80 u 85). Las composiciones con un agente tensioactivo comprenderán de modo conveniente entre 0.05 y 5% agente tensioactivo, y puede ser de entre 0.1 y 2.5%. Se apreciará que se pueden agregar otros ingredientes, por ejemplo manitol u otros

vehículos farmacéuticamente aceptables, si es necesario.

Las emulsiones adecuadas pueden ser preparadas utilizando emulsiones grasas comercialmente disponibles, tales como Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ y Lipiphysan™. El ingrediente activo puede ser disuelto en una composición de emulsión pre-mezclada o alternativamente puede ser disuelto en un aceite (por ejemplo, aceite de soya, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de ajonjolí, aceite de maíz o aceite de almendra) y una emulsión formada al mezclar con un fosfolípido (por ejemplo fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soya o lecitina de soya) y agua. Se apreciará que se pueden agregar otros ingredientes, por ejemplo glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas contendrán típicamente hasta 20% de aceite, por ejemplo, entre 5 y 20%. La emulsión grasa puede comprender gotas de grasa entre 0.1 y 1.0 μm , en particular 0.1 y 0.5 μm , y tienen un pH en el rango de 5.5 hasta 8.0.

Las composiciones de emulsión pueden ser aquellas preparadas a través del mezclado de un anticuerpo Trop-2 o un conjugado de anticuerpo Trop-2 con Intralipid™ o los componentes de los mismos (aceite de soya, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en solventes farmacéuticamente aceptables, acuosos u orgánicos, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones sólidas y líquidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se estableció con anterioridad. En ciertas modalidades, las composiciones son administradas a través de la vía oral o respiratoria nasal para efecto local o sistémico. Las composiciones en solventes farmacéuticamente aceptables de preferencia estériles pueden ser nebulizadas a través del uso de gases. Las soluciones nebulizadas pueden ser aspiradas

directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede ser fijado a una mascarilla, carpa o respirador con presión positiva intermitente. Las composiciones de solución, suspensión o polvo pueden ser administradas, de preferencia oral o
5 nasalmente, a partir de dispositivos que suministran la formulación de una manera apropiada.

Composiciones

10 Las composiciones usadas en los métodos de la invención comprenden una cantidad efectiva de un anticuerpo Trop-2 o un conjugado de anticuerpo Trop-2 como se describe en la presente. Los ejemplos de dichas composiciones, así como su formulación, se describen también en una sección previa y a continuación. En ciertas
15 modalidades, la composición comprende uno o más anticuerpos Trop-2 o conjugados de anticuerpo Trop-2. Por ejemplo, el anticuerpo Trop-2 reconoce Trop-2 humano. En ciertas modalidades, el anticuerpo Trop-2 es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo quimérico. En ciertas modalidades, el
20 anticuerpo Trop-2 comprende una región constante que es capaz de activar una respuesta inmune deseada, tal como una lisis anticuerpo-mediada o ADCC. En otras modalidades, el anticuerpo Trop-2 comprende una región constante que no activa una respuesta inmune no buscada ni deseada, tal como lisis anticuerpo-mediada o ADCC.
25 En otras modalidades, el anticuerpo Trop-2 comprende una o más CDR(s) del anticuerpo (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o, en ciertas modalidades, las seis CDRs).

Se entiende que las composiciones pueden comprender más de un anticuerpo Trop-2 o conjugado de anticuerpo Trop-2 (por ejemplo
30 una mezcla de anticuerpos Trop-2 que reconocen diferentes epítopes de Trop-2). Otras composiciones ilustrativas comprenden más de un anticuerpo Trop-2 o conjugado de anticuerpo Trop-2 que reconocen el o los mismos epítopes, o diferentes especies de anticuerpos Trop-2 o de conjugado de anticuerpo Trop-2 que se enlazan a diferentes

epítopes de Trop-2 (por ejemplo, Trop-2 humano).

La composición usada en la presente invención puede comprender además vehículos, excipiente, o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington: The Science and practice of Pharmacy 21st Ed., 2005, Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones, y pueden comprender soluciones reguladoras de pH tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservadores (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albumina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sal como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o agentes tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilen glicol (PEG). Se describen en la presente de manera adicional excipientes farmacéuticamente aceptables.

Equipos

La invención proporciona también equipos para uso en los

métodos actuales. Los equipos de la invención incluyen uno o más recipientes que comprenden el anticuerpo Trop-2 o el conjugado de anticuerpo Trop-2 como se describe aquí e instrucciones para uso de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención descritos. En general, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración del anticuerpo Trop-2 o el conjugado de anticuerpo Trop-2 para los tratamientos terapéuticos descritos con anterioridad.

Las instrucciones en relación con el uso de los anticuerpos Trop-2 o los conjugados de anticuerpo Trop-2 como se describen en la presente incluyen de modo general información para la dosificación, programa de dosificación y ruta de administración para el tratamiento pretendido. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (por ejemplo, paquetes multi-dosis) o dosis de sub-unidad. Las instrucciones suministradas en los equipos de la invención son, de manera común, instrucciones escritas en una etiqueta o inserto de paquete (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el equipo), aunque también son aceptables instrucciones legibles por máquina (por ejemplo, instrucciones almacenadas en un dispositivo de almacenamiento magnético u óptico).

Los equipos de la invención están en empaque adecuado. El empaque adecuado incluye, aunque sin limitarse a, envases, botellas, jarras, empaque flexible (por ejemplo, bolsas Mylar o plásticas selladas), y similares. Están considerados también paquetes para uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un equipo puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa o envase de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por medio de una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente puede tener de igual modo un puerto de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa o envase de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por medio de una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un ingrediente activo en la composición es un anticuerpo Trop-2. El

recipiente puede comprender además un segundo agente farmacéuticamente activo.

Los equipos pueden proporcionar de manera opcional componentes tales como soluciones reguladoras de pH e información interpretativa. De manera normal, el equipo comprende un recipiente y una etiqueta o inserto(s) de paquete en o asociados con el recipiente.

10 Mutaciones y Modificaciones

Para expresar los anticuerpos Trop-2 de la presente invención, los fragmentos ADN que codifican las regiones VH y VL se pueden obtener primero utilizando cualquiera de los métodos antes descritos. Se pueden introducir también varias modificaciones, por ejemplo, mutaciones, sustituciones, eliminaciones, y/o adiciones en las secuencias de ADN utilizando métodos estándar conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Por ejemplo, la mutagénesis se puede llevar a cabo utilizando métodos estándar, tales como mutagénesis PCR-mediada, en la cual los nucleótidos mutados son incorporados dentro de los iniciadores PCR de modo que el producto PCR contiene las mutaciones deseadas o la mutagénesis dirigida al sitio.

Un tipo de sustitución, por ejemplo, que se puede efectuar es cambiar una o más de las cisteínas en el anticuerpo, las cuales pueden ser químicamente reactivas, para otro residuo, tal como, sin limitación, alanina o serina. Por ejemplo, puede haber una sustitución de cisteína no-canónica. La sustitución se puede hacer en una CDR o región de estructura de un dominio variable o en la región constante de un anticuerpo. En ciertas modalidades, la cisteína es canónica.

Los anticuerpos también pueden ser modificados, por ejemplo en los dominios variables de las cadenas pesada y/o

ligera, por ejemplo, para alterar una propiedad de enlace del anticuerpo. Por ejemplo, se puede hacer una mutación en una o más de las regiones CDR para incrementar o reducir la K_D del anticuerpo para Trop-2, para incrementar o reducir k_{off} , o para alterar la
5 especificidad de enlace del anticuerpo. Las técnicas de mutagénesis dirigida en el sitio son bien conocidas en la técnica. Véase por ejemplo, Sambrook et al. y Ausubel et al., supra.

También se puede hacer una modificación o mutación en una región de estructura o región constante para incrementar la vida
10 media de un anticuerpo Trop-2. Véase por ejemplo, la Publicación PCT No. WO 00/09560. También se puede efectuar una mutación en la región de estructura o región constante para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, a fin de proporcionar un sitio para enlace covalente o no covalente a otra molécula, o para alterar
15 propiedades tales como la fijación de complemento, enlace FcR y citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo. De acuerdo con la invención, un anticuerpo individual puede tener mutaciones en una o más de las CDRs o regiones de estructura del dominio variable o en la región constante.

20 En un proceso conocido como "serie de células germinales", ciertos aminoácidos en las secuencias VH y VL pueden ser mutados para igualar a aquellos encontrados de manera natural en las secuencias VH y VL de línea germinal. En particular, las secuencias de aminoácido de las regiones de estructura en las secuencias VH y
25 VL pueden ser mutadas para igualar las secuencias de línea germinal a fin de reducir el riesgo de inmunogenicidad cuando se administra el anticuerpo. Las secuencias ADN de línea germinal para genes VH y VL humanos son conocidas en la técnica (véase por ejemplo, la base de datos de secuencia de línea germinal "Vbase"; véase también
30 Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson et al., J. Mol. Biol. 227:776-798, 1992; y Cox et al., Eur. J. Immunol. 24:827-836, 1994.

Otro tipo de sustitución de aminoácido que se puede hacer es

remover los sitios proteolíticos potenciales en el anticuerpo. Dichos sitios pueden presentarse en una CDR o región de estructura de un dominio variable o en la región constante de un anticuerpo. La sustitución de residuos de cisteína y la
5 remoción de sitios proteolíticos pueden reducir el riesgo de heterogeneidad en el producto de anticuerpo y por tanto incrementar su homogeneidad. Otro tipo de sustitución de aminoácido es eliminar los pares asparagina-glicina, que forman sitios de desamidación potenciales, mediante la
10 alteración de uno o ambos residuos. En otro ejemplo, se puede separar la lisina C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo Trop-2 de la invención. En varias modalidades de la invención, las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos Trop-2 pueden incluir de manera opcional una secuencia de señal.

15 Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL de la presente invención, estos fragmentos de ADN pueden ser manipulados adicionalmente a través de técnicas de ADN recombinantes estándar, por ejemplo para convertir los genes de región
20 variable a genes de cadena de anticuerpo completa, genes de fragmento Fab, o a un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL- o VH- es enlazado de manera operativa a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un
25 ligador flexible. El término "enlazado de manera operativa", como se usa en este contexto, está destinado a significar que dos fragmentos de ADN se unen de modo que las secuencias de aminoácido codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen dentro del marco de lectura.

30 El ADN aislado que codifica la región VH puede ser convertido a un gen de cadena pesada completa al enlazar de manera operativa el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de

cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que comprenden estas regiones se pueden obtener a través de 5 amplificación PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, aunque de mayor preferencia es una región constante IgG1 o IgG2. La secuencia de región constante IgG puede ser 10 cualquiera de los diferentes alelos o alotipos conocidos que se presentan entre diferentes individuos, tales como Gm(1), Gm(2), Gm(3), y Gm(17). Estos alotipos representan sustitución de aminoácido de presencia natural en las regiones constantes IgG1. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que 15 codifica VH puede ser enlazado de manera operativa a otra molécula de ADN que codifica sólo la región constante CH1 de cadena pesada. La región constante de cadena pesada CH1 puede ser derivada a partir de cualquiera de los genes de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede ser convertido 20 a un gen de cadena ligera completa (así como un gen de cadena ligera Fab) al enlazar de manera operativa el ADN que codifica VL a otra molécula ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humanos son conocidas en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. 25 A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y los fragmentos ADN que comprenden estas regiones se pueden obtener a través de amplificación PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región 30 constante kappa o lambda. La región constante kappa puede ser cualquiera de los diferentes alelos conocidos que se presentan entre diferentes individuos, tales como Inv(1), Inv(2), e Inv(3). La región constante lambda puede ser derivada a partir de cualquiera de los tres genes lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH- y VL son enlazados de manera operativa a otro fragmento que codifica un ligador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácido (Gly₄-Ser)₃, (NO ID SEC: 5 16) de modo que las secuencias VH y VL pueden ser expresadas como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas por medio del ligador flexible (Véase por ejemplo, Bird et al., 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 10 McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554. El anticuerpo de cadena sencilla puede ser monovalente, si solamente se emplean una VH y VL individuales, bivalente, si se utilizan dos VH y VL, o polivalente, si se usan más de dos VH y VL. Se pueden generar anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se 15 enlazan de manera específica a Trop-2 y otra molécula.

En otra modalidad, se puede elaborar un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina que comprende todo o una porción de un anticuerpo Trop-2 de la invención enlazado a otro polipéptido. En otra modalidad, sólo los dominios variables del 20 anticuerpo Trop-2 están enlazados al polipéptido. En otra modalidad, el dominio VH de un anticuerpo Trop-2 es enlazado a un primer polipéptido, en tanto que el dominio VL de un anticuerpo Trop-2 es enlazado a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de una manera tal que los 25 dominios VH y VL pueden interactuar entre sí para formar un sitio de enlace de antígeno. En otra modalidad preferida, el dominio VH es separado del dominio VL por medio de un ligador de manera que los dominios VH y VL pueden interactuar entre sí. El ligador VH-anticuerpo VL es enlazado después al 30 polipéptido de interés. Además, se pueden crear anticuerpos de fusión en los cuales dos (o más) anticuerpos de cadena sencilla son enlazados entre sí. Esto es útil si se desea crear un anticuerpo divalente o polivalente en una cadena de polipéptido sencilla, o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

En otras modalidades, se pueden preparar otros anticuerpos modificados utilizando el anticuerpo Trop-2 que codifica moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, se pueden preparar "cuerpos Kappa" (III et al., Protein Eng. 10:949-57, 1997), "Minicuerpos" (Martin et al., EMBO J., 13:5303-9, 1994), "Diacuerpos" (Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993), o "Janusinos" (Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659, 1991 y Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52, 1992) utilizando técnicas biológicas moleculares estándar siguiendo las enseñanzas de la especificación.

Los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de enlace de antígeno se pueden producir a través de una variedad de métodos que incluyen fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Véase por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, 1990, Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553, 1992. Además, se pueden formar anticuerpos biespecíficos como "diacuerpos" o "Janusinos". En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico se enlaza a dos epítopes diferentes de Trop-2. En ciertas modalidades, los anticuerpos modificados descritos con anterioridad se preparan utilizando uno o más de los dominios variables o regiones CDR a partir de los anticuerpos Trop-2 proporcionados aquí.

Los materiales representativos de la presente invención fueron depositados en la American Type Culture Collection (ATCC) el 26 de abril 2012. El vector que tiene el No. de Acceso ATCC PTA-12872 es un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo Trop-2 humanizado, y un vector que tiene el No. de Acceso ATCC PTA-12871 es un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo Trop-2 humanizado. Los depósitos se elaboraron bajo las condiciones del Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and Regulations thereunder (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito estará disponible con la ATCC bajo los

términos del Tratado de Budapest, y sujeto a un convenio entre Pfizer, Inc. y ATCC, el cual asegura la disponibilidad permanente e irrestricta de la progenie del cultivo del depósito para el público a la emisión de la patente de los Estados Unidos pertinente o a la apertura para el público de cualquier solicitud de patente de los Estados Unidos o extranjera, lo que ocurra primero, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por el Comisionado de Patentes y Marcas de los Estados Unidos que estará autorizado por el mismo de acuerdo con 35 U.S.C. Sección 122 y las reglas del Comisionado de conformidad con el convenio (que incluye 37 C.F.R. Sección 1.14 con referencia particular a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha convenido que si un cultivo de los materiales en depósito se inactivará o se perdiera o fuera destruido cuando era cultivado bajo condiciones adecuadas, los materiales serán remplazados a la brevedad mediante notificación con otro del mismo tipo. La disponibilidad del material depositado no será considerada como una licencia para la práctica de la invención en contravención de los derechos otorgados por cualquier gobierno de conformidad con sus leyes de patentes.

Se ofrecen los siguientes ejemplos solamente para fines ilustrativos, y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención en forma alguna. De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en la presente se volverán evidentes para aquellos con experiencia en la técnica a partir de la descripción anterior y quedarán dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

30 Ejemplos

Ejemplo 1: Determinación de Afinidad de Enlace de Anticuerpo para Anticuerpos de Ratón Anti-Trop-2 Recombinantes

Se midieron las afinidades de anticuerpos de ratón anti-Trop-2 generados a partir de hibridomas en una resonancia plasmónica de superficie Biacore TM 2000 o biosensor 3000 equipado con un microcircuito de sensor CM5 de grado de investigación (BiacoreTM AB, Uppsala, Suecia — ahora GE Healthcare). El IgG de anti-ratón fue acoplado primero a amina a la superficie de sensor CM5. Varios IgGs de ratón anti-Trop-2 fueron capturados después por medio de IgG anti-ratón. El dominio extracelular Trop-2 monomérico preparado a partir de digestión de papaína de Trop-2-proteína de fusión Fc fue inyectado después como el analito en series de dilución triples. La afinidad de los anticuerpos de ratón anti-Trop-2 varía desde 7.5 hasta 31.8 nM. Cuadro 4.

Cuadro 4

Anticuerpo	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(nM) para huTrop-2
3E9	1.83E+05	2.38E-03	13.0
6G11	2.70E+05	8.60E-03	31.8
7E6	1.60E+05	1.19E-03	7.5
15E2	1.61E+05	4.07E-03	25.3
18B1	4.37E+05	1.04E-02	23.8

Ejemplo 2: Mapeo de Dominio de Anticuerpos de Ratón Anti-Trop-2 Recombinantes

El mapeo de dominio se efectuó mediante intercambio de los dominios extracelulares Trop-2 ya sea con regiones equivalentes Trop-1 (EpCAM) o Trop-2 de ratón. Véanse las Figuras 4-5. Los anticuerpos anti-Trop-2 3E9, 6G11, 7E6, y 18B1 (expresados como IgG2a de ratón recombinante) no se enlazan a Trop-1 humano o Trop-2 de ratón en tanto que 15E2 se enlaza a Trop-2 de ratón aunque no a Trop-1 humano. Estas proteínas híbridas fueron expresadas como proteínas de fusión Fc humanas en células 293F. El enlace de anticuerpos anti-Trop-2 a estos híbridos de dominio se determinó por medio de Biacore. El reconocimiento de ciertos dominios Trop-2 humanos a través de anticuerpos anti-Trop-2 se definió cuando el intercambio de dominio resulta en pérdida o

reducción del enlace. Los clones de anticuerpo anti-Trop-2, 3E9, 7E6, y 15E2 se enlazan a dominios 3 y 4 en tanto que los clones 6G11 y 18B1 se enlazan al dominio 1. Cuadro 5. Se puede encontrar la definición de varios dominios de Trop-2, por ejemplo, en Chong et al., J. Biol. Chem. 276(8):5804-13, 2001.

Cuadro 5

Enlace de anticuerpos anti-Trop-2 a diferentes dominios Trop-2					
	reemplazo de dominio	dominio 1	dominio 2	dominio 3	dominio 4
3E9	hTrop1	-	-	+	+
	mTrop-2	-	-	+/-	+
6G11	hTrop1	+	-	-	-
	mTrop-2	+	-	-	-
7E6	hTrop1	-	-	+	+
	mTrop-2	-	-	-	+
15E2	hTrop1	-	-	+	+/-
	mTrop-2	-	-	+/-	-
18B1	hTrop1	+	-	-	-
	mTrop-2	+	-	-	-

+ indica reemplazo de dominio que resulta en pérdida de enlace

10 +/- indica reemplazo de dominio que resulta en reducción de enlace

- indica dosis de reemplazo de dominio que no afecta el enlace

Ejemplo 3: Estudios de Eficacia *In Vivo* Con Modelo de Xenoinjerto Colo205

15

Se realizaron estudios de eficacia *in vivo* de IgGs de ratón Anti-Trop-2 con modelo de xenoinjerto colo205 que expresa objetivo. Un millón de células de cáncer de colon colo205 fueron implantadas de manera subcutánea en ratones un/un de 5-8 semanas de edad (día 0). Los animales fueron aleatorizados mediante peso corporal al día siguiente (día 1) en diferentes grupos de tratamiento (grupo de control IgG, 7E6, 15E2, o 18B1; n=10/grupo). 20mg/kg de anticuerpos anti-Trop-2 a partir de diferentes grupos de tratamiento e mIgG de control

20

recibieron la administración a través de inyección de bolo en la vena de la cola tres veces por semana para un total de 12 dosis. Todos los animales del experimento fueron monitoreados para cambios de peso corporal diariamente. El volumen de tumor fue medido dos veces por semana por medio de un dispositivo Caliper y calculado con la siguiente fórmula: Volumen de tumor = (longitud x anchura²)/2. Los estudios se terminaron antes de que los volúmenes de tumor alcanzaran 2000 mm³. Se determinó la TGI (% de inhibición de crecimiento de tumor) como $[1 - \text{tamaños de tumor (grupo de tratamiento)} / \text{tamaño de tumor (grupo de control)}] \times 100$. El Cuadro 6 y la Figura 1 muestran que los anticuerpos 7E6, 15E2, y 18B1 anti-Trop-2 inhiben el crecimiento de tumor de xenoinjerto Colo205 *in vivo*.

Cuadro 6

tratamiento de anticuerpo	Volumen de tumor medio (mm ³) en día 43	TGI (Inhibición de crecimiento de tumor)
control IgG	673.0	0%
7E6	163.8	76%
15E2	582.0	14%
18B1	423.5	37%

Ejemplo 4: Estudios de Eficacia *In Vivo* con Modelo de Xenoinjerto A431

a) *Inhibición de Crecimiento de Tumor de Xenoinjerto A431 por medio de anticuerpos 7E6, 15E2, y 5 18B1 Anti-Trop-2.*

Se efectuaron estudios de eficacia *in vivo* de IgGs de ratón anti-Trop-2 con modelo de xenoinjerto A431 que expresa el objetivo. Se implantaron dos millones de células cancerosas epidermoides A431 de manera subcutánea en ratones nu/nu de 5-8 semanas de edad hasta que los tamaños de tumor alcanzaron aproximadamente 100 mm³. Los animales fueron aleatorizados por tamaños de tumor y la dosificación se efectuó a través de inyección de bolo en la vena de la cola. Los anticuerpos anti-Trop-2 fueron expresados como anticuerpos IgG2a de ratón recombinantes a partir de la expresión

transitoria 293F. 20mg/kg de anticuerpos anti-Trop-2 (18B1, 15E2, y 7E6 recombinantes mIgG2a) o IgG de control fueron administrados a través de inyección de bolo en la vena de la cola dos veces por semana para un total de 6 dosis. El volumen de tumor fue medido dos veces por semana por medio de un dispositivo Caliper y calculado con la siguiente fórmula: Volumen de tumor = (longitud x anchura²)/2. Los estudios fueron terminados antes de que los tamaños de tumor alcanzaran 2000 mm³. Se determinó TGI (% de inhibición de crecimiento de tumor) como [1-tamaños de tumor (grupo de tratamiento)/tamaño de tumor (grupo de control)] x 100. El Cuadro 7A y la Figura 2A muestran que los anticuerpos 7E6, 15E2, y 18B1 anti-Trop 2 inhiben el crecimiento de tumor de xenoinjerto A431 *in vivo*.

15

Cuadro 7A

tratamiento de anticuerpo	Volumen de tumor medio (mm ³) en día 27	TGI (Inhibición de crecimiento de tumor)
control IgG	1814.8	0%
7E6	770.7	58%
15E2	953.6	47%
18B1	875.5	52%

b) Inhibición de Crecimiento de Tumor de Xenoinjerto A431 mediante Anticuerpo 7E6 Anti-Trop-2 en Estudio de Respuesta de Dosis

Utilizando el mismo modelo de xenoinjerto que se describió en el Ejemplo 4a anterior, se administraron varias dosis de anticuerpo 7E6 anti-Trop-2 (5, 10, y 20 mg/kg) o 20 mg/kg IgG de control a través de inyección de bolo en la vena de la cola dos veces por semana para un total de 6 dosis. El Cuadro 7B y la Figura 2B muestra la inhibición de crecimiento de tumor de xenoinjerto A431 *in vivo* a través de varias dosis de 7E6.

25

Cuadro 7B

tratamiento de anticuerpo	Volumen de tumor medio (mm ³) en día 27	TGI (Inhibición de crecimiento de tumor)
control IgG	1814.8	0%
7E6-5mg/kg	913.9	50%
7E6-10mg/kg	897.7	51%
7E6-20mg/kg	875.5	52%

c) Inhibición de Crecimiento de Tumor de Xenoinjerto A431 por medio de Anticuerpos 6G11, 7E6, y 18B1 Anti-Trop-2.

- 5 De manera similar, 20 mg/kg de anticuerpos anti-Trop-2 (6G11, 7E6, y 18B1 e IgG de control), todos expresados de manera recombinante como mIgG2s, fueron administrados a través de inyección de bolo en la vena de la cola una vez por semana para un total de 3 dosis en el modelo de xenoinjerto A431 como se describió en el Ejemplo 4a). El Cuadro 7C y la Figura 2C muestran que los anticuerpos 6G11, 7E6, e 18B1 anti-Trop 2 inhiben el crecimiento de tumor de xenoinjerto A431 *in vivo*.

Cuadro 7C

tratamiento de anticuerpo	Volumen de tumor medio (mm ³) en día 27	TGI (Inhibición de crecimiento de tumor)
control IgG	1044.0	0%
6G11	444.8	57%
7E6	561.0	46%
18B1	477.6	54%

15

Ejemplo 5: Determinación de Afinidad de Enlace de Anticuerpo para Anticuerpos-7E6 Anti-Trop-2 Humanizados

- 20 Las afinidades de anticuerpos 7E6 anti-Trop-2 quiméricos y humanizados se midieron en un biosensor de resonancia plasmónica de superficie Biacore™ T200 equipado con un microcircuito de sensor CM4 de grado de investigación (Biacore™ AB, Uppsala,

Suecia — ahora GE Healthcare). Las proteínas Trop-2-hFc humana o Trop-2-hFc de mono cynomolgus fueron capturadas en la superficie de sensor 37 de microcircuito CM5 EDA acoplada con Fc anti-humano. Los fragmentos Fab recombinantes 7E6 quiméricos y humanizados fueron inyectados como series de dilución triple. Los Cuadros 8A y 8B muestran la medición de afinidad de anticuerpos 7E6 anti-Trop-2 humanizados para proteína Trop-2 humana y de mono cynomolgus, respectivamente.

10

Cuadro 8A

Anticuerpo	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(nM) to huTrop-2
mouse7E6	1.66E+05	1.34E-03	8.08
h7E6-WT	1.39E+05	2.94E-03	21.10
h7E6_SVG	9.76E+04	4.35E-04	4.46
h7E6_L	1.30E+05	1.50E-04	1.15
h7E6_SVGL	1.31E+05	3.27E-05	0.25

Cuadro 8B

Anticuerpo	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(nM) to cynoTrop-2
mouse7E6	1.45E+05	2.40E-03	16.50
h7E6-WT	1.44E+05	6.35E-03	44.00
h7E6_SVG	2.65E+05	1.89E-03	7.00
h7E6_L	1.26E+05	3.35E-04	2.66
h7E6_SVGL	1.30E+05	7.42E-05	0.57

15 Ejemplo 6: Determinación de Afinidad de Enlace de Anticuerpo para Anticuerpos—6G11 Anti-Trop-2 Humanizados

Las afinidades de anticuerpos 6G11 humanizados fueron medidas en un biosensor de resonancia plasmónica de superficie Biacore™ 2000 equipado con un microcircuito de sensor CM5 de grado de investigación (Biacore™ AB, Uppsala, Suecia — ahora GE Healthcare). La proteína Trop-2-mFc humana fue capturada en el microcircuito CM5 acoplada con Fc

20

anti-ratón. Los fragmentos Fab 6G11_WT humanos o 6G11_FKG_SF quiméricos fueron inyectados como series de dilución triples. El Cuadro 9 muestra la medición de afinidad de anticuerpos 6G11 anti-Trop-2 humanizados para proteína Trop-2 humana.

5

Cuadro 9

Anticuerpo	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	KD(nM) to huTrop-2
h6G11_WT	3.60E+05	9.60E-03	27.0
h6G11_FKG_SF	6.40E+05	3.80E-04	0.6

Ejemplo 7: Citometría de Flujo de Anticuerpos Anti-Trop-2 de Ratón y Humanizados en Células Tumorales Positivas y Negativas para Trop-2

10

a) 7E6

El enlace de anticuerpos 7E6 anti-Trop-2 quiméricos de ratón y humanizados (expresados en el subtipo IgG1 humano) fue evaluado en la expresión de Trop-2 (A431 y Colo205) y las células sin expresión (SW620) por medio de citometría de flujo. Para tinción de célula A431, se incubaron 200,000 células con 0.5 ug de anticuerpo en 100uL de solución reguladora de enlace (PBS (Solución Salina Regulada con Fosfato) + 0.5% BSA (Albumina de Suero Bovina)), seguida por incubación con **Dylight488-conjugated goat anti-human (Fab')2-specific secondary antibody** a partir de Jackson immunoresearch Laboratories (West Grove, PA). Para las células Colo205 y SW620, se utilizaron 300,000 células con 1 ug de anticuerpo primario, seguidas por **AlexaFluor 647 anti-human (Fab')2-specific secondary antibody** a partir de Jackson immunoresearch Laboratories (West Grove, PA). El Cuadro 10 muestra por lo menos aproximadamente 93% de enlace en células tumorales positivas para Trop-2 mediante anticuerpos 7E6 de ratón y 7E6 humanizados.

30

Cuadro 10

	A431 (Trop-2+++)		Colo205 (Trop-2 +)		SW620 (Trop-2 -)	
Anticuerpo	MFI	% positivo	MFI	% positivo	MFI	% positivo
sólo 2nd Ab	1049	3.4	183	3.9	154	2.0
7E6 de ratón	103000	94.0	2258	99.0	149	2.2
h7E6_WT	102000	94.8	1761	99.0	143	2.1
h7E6_SVG	121000	96.7	2425	100.0	139	2.4
h7E6_L	110000	95.1	2469	100.0	158	2.5
h7E6_N	149000	98.6	2698	100.0	151	2.3
h7E6_SVGL	107000	93.1	2425	100.0	135	2.6
h7E6_SVGN	128000	98.1	2734	100.0	140	2.5

b) 6G11

Similar al Ejemplo 7a), se evaluó el enlace de anticuerpos 6G11 anti-Trop-2 quiméricos de ratón y humanizados (expresados en el subtipo IgG1 humano) en células que expresan Trop-2 (A431 y Colo205) y sin expresión (SW620) por medio de citometría de flujo. Se utilizaron 300,000 células con 1 ug del anticuerpo primario, seguidas por **AlexaFluor 647 anti-human (Fab')2-specific secondary antibody**. El Cuadro 11 muestra por lo menos aproximadamente 99% de enlace en las células positivas para Trop-2 por medio de anticuerpos 6G11 de ratón y 6G11 humanizados.

Cuadro 11

	A431 (Trop-2+++)		Colo205 (Trop-2 +)		SW620 (Trop-2 -)	
Anticuerpo	MFI	% positivo	MFI	% positivo	MFI	% positivo
sólo 2nd Ab	718	4.9	183	3.9	154	2.0
6G11 de ratón	16204	99.9	1667	100.0	134	2.5
h6G11_WT	19573	99.9	1716	99.0	154	3.9
h6G11_FKG_SF	20254	99.9	2064	100.0	157	2.5

Ejemplo 8: Actividad ADCC de Anticuerpos 7E6 hIgG1 Anti-Trop-2 Quiméricos y Humanizados en Células A431

La actividad ADCC (citotoxicidad anticuerpo-dependiente)

de anticuerpos 7E6 de ratón quiméricos (h7E6-WT) y de IgG1 humano anti-Trop-2 humanizados (h7E6 SVG (región VH), h7E6_L (región VL), y h7E6-SVGL (ambas regiones VH y VL)) se determinó con el equipo de ensayo de citotoxicidad no radiactiva cytoTox 96 (Promega, Madison WI). Las células A431 que expresan el objetivo fueron cultivadas a 10,000 células/pozo el día anterior al ensayo. PBMCs donadoras (Células Mononucleares de Sangre Periférica Criopreservadas) fueron aisladas a través de gradiente Ficoll y cultivadas durante la noche a 37°C en medio X-VIVO (Lonza, Wakersville, MO). Los anticuerpos fueron agregados a los pozos el día siguiente en las concentraciones indicadas en la Figura 3, seguidos por la adición de 500,000 células PBMC (E:T=50:1) en RPMI+5% FBS (Suero Bovino Fetal). Se utilizó el anticuerpo anti-EGFR (Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico) (ERBITUX®, Imclone, Bridgewater, NJ) como un control positivo para el ensayo. Las placas fueron incubadas después a 37°C durante 4 horas. En un punto de tiempo a 3 y media horas, se agregaron 20 uL de la solución de lisis a los pozos sólo de células de objetivo. Después de someter la placa a giro a 8000 rpm durante 3 minutos, 50uL de sobrenadantes fueron transferidos a otra placa. Se agregaron después 50 ul de sustrato a cada pozo y la placa fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad. La reacción fue detenida mediante la adición de 50uL de solución de cese de reacción de Promega (Madison, WI) a cada pozo. Las placas fueron leídas después a 490nm con un espectrofotómetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se calcularon los porcentajes (%) de lisis específica con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ lisis específica} = \frac{(\text{liberación LDH (Lactato Deshidrogenasa) tratamiento} - \text{liberación LDH espontánea de célula de objetivo} - \text{liberación LDH espontánea de célula efectora})}{(\text{liberación LDH máxima de célula de objetivo} - \text{liberación LDH espontánea de célula de objetivo})} \times 100.$$

La Figura 3 muestra que ambos anticuerpos 7E6 IgG1 anti-Trop-2 de ratón quiméricos y humanizados indujeron la inactivación

ADCC en las células A431.

Ejemplo 9: Citotoxicidad de ADCs Anti-Trop-2 en Células Positivas para Trop-2

5 Anticuerpos anti-Trop-2 de ratón quiméricos (6G11 y 7E6) y humanizados (h7E6-SVG, h7E6-SVGL, y h7E6-SVGN) fueron expresados como subtipos IgG1 humanos modificados genéticamente con marcadores de transglutaminasa que contienen glutamina ("Q") (por ejemplo, TG1, LCQ03, y TG6
10 corresponden a los Nos ID SEC: 75, (LLQGG); 78 (GGLLQGA), y 79 (LLQGA), respectivamente) y conjugados con AcLys-vcMMAD (Acetil-Lisina-Valina-Citrulina-MMAD), aminocaproil-vc-PABC-MMAD (aminocaproil-Valina-Citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-MMAD), o AcLys-vc-PABC-MMAD
15 (Acetil-Lisina-Valina-Citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-MMAD) como se indica en el Cuadro 12. En un caso, los marcadores de transglutaminasa pueden ser modificados genéticamente en el extremo C de la cadena ligera o la cadena pesada del anticuerpo; en otro caso, el marcador de transglutaminasa (por
20 ejemplo, Q) es modificado genéticamente en otro sitio del anticuerpo, tal como en la posición 297 del IgG humano (esquema de numeración de Kabat). Por ejemplo, el aminoácido asparagina de tipo natural (N) es sustituido con glutamina en la posición 297 del anticuerpo Trop-2 (N297Q). La conjugación del
25 anticuerpo anti-Trop-2 para MMAD se logró después a través de reacción de transamidación transglutaminasa-catalizada microbial entre el anticuerpo anti-Trop-2 que lleva un marcador que contiene glutamina en el sitio específico (por ejemplo, extremo carboxilo o extremo amino de la cadena pesada o la
30 cadena ligera, posición 297, o en otro sitio del anticuerpo) y un derivado que contiene amina de la carga útil (por ejemplo, MMAD). En ciertos casos, el aminoácido lisina de tipo natural en el extremo carboxilo (posición 447 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat) fue eliminado y remplazado

con el marcador Q. En otros casos, el aminoácido lisina de tipo natural en la posición 222, 340, o 370 (de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat) fue remplazado con aminoácido arginina ("K222R", "K340R", o "K370R"). Por ejemplo, se encontró que la sustitución K222R tiene el efecto sorpresivo de resultar en un anticuerpo y conjugado de carga útil más homogéneos, mejor entrelazamiento intermolecular entre el anticuerpo y la carga útil y/o reducción significativa del entrelazamiento intercadena con el marcador glutamina en el extremo C de la cadena ligera del anticuerpo. En la reacción de transamidación, la glutamina en el anticuerpo actuó como un donador de acilo, y el compuesto que contiene amina actuó como un aceptor de acilo (donador de amina). El anticuerpo anti-Trop-2 purificado en la concentración de 1.67-4.04 μM fue incubado con un aceptor de acilo en exceso 20-100 M, variando entre 167-404 μM , en presencia de 0.225-0.545% (p/v) *Streptovercillium mobaraense* transglutaminasa (ACTIVATM, Ajinomoto, Japón) en 150-900 mM NaCl, y 25 mM MES, HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico] o regulador Tris HCl en un rango de pH de 6.2-8.8. Las condiciones de reacción fueron ajustadas para derivados de aceptor de acilo individual, y la eficiencia óptima y especificidad se observaron comúnmente para 2.87 μM de anticuerpo, 287 μM de derivado, y 0.378% (p/v) de transglutaminasa en 150 mM NaCl, 25 mM Tris HCl, pH 8.8. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 2.5 horas, el anticuerpo fue purificado en resina MabSelect (GE Healthcare, Waukesha, WI) utilizando métodos de cromatografía de afinidad estándar conocidos por las personas con experiencia en la técnica, como la cromatografía de afinidad comercial de GE Healthcare.

Las células que expresan el objetivo (A431, BxPC3, CAPAN-2 y Colo205) o sin expresión (SW620) fueron cultivadas en placas de fondo transparente y paredes blancas a 2000 células/pozo durante 24 horas antes del tratamiento. Las células fueron tratadas con conjugados anticuerpo-fármaco diluidos cuatro veces por triplicados. La viabilidad celular se determine a través de CellTiter-Glo'

Luminescent Cell Viability Assay 96 (Promega, Madison WI) 96 horas después del tratamiento. La viabilidad celular relativa fue determinada como porcentaje del control no tratado. Se calculó IC50 por medio del software Prisco. El Cuadro 12 muestra que los anticuerpos 7E6 anti-Trop-2 de ratón quiméricos y humanizados para MMAD a través de marcador de transglutaminasa ejercen potente actividad de inactivación celular en las células que expresan Trop-2.

10 Cuadro 12

			A431(Trop-2+++)		BxPC3(Trop-2++)		CAPAN-2(Trop-2+/++)		Colo205 (Trop-2+)		SW620 (Trop-2-)	
Nombre	conjugado	Carga	Ab-IC50 ug/mL	Ab-IC50 (nM)	Ab-IC50 ug/mL	Ab-IC50 (nM)	Ab-IC50 ug/mL	Ab-IC50 (nM)	Ab-IC50 (ug/mL)	Ab-IC50 (nM)	Ab-IC50 ug/mL	Ab-IC50 (nM)
6G11-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.86	0.030	0.197					0.379	2.525		
7E6-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.87	0.016	0.109	0.027	0.179	2.320	15.467	0.152	1.011	14.180	94.533
h7E6-WT-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.79	0.022	0.144	0.025	0.169	1.956	13.040	0.445	2.969	10.330	68.867
h7E6-L-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.85	0.020	0.132	0.035	0.232	2.027	13.513	0.082	0.549	8.535	56.900
h7E6-N-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.87	0.024	0.163			2.021	13.473	0.100	0.668	11.150	74.333
h7E6-SVG-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.88	0.016	0.105	0.031	0.206	1.659	11.060	0.118	0.787	10.680	71.200

h7E6-SVGL-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.85	0.018	0.120			2.440	16.267	0.052	0.345	10.800	72.000
h7E6-SVGN-TG1-vcMMA D	AcLys-vcMMA D	1.87	0.023	0.153	0.051	0.337	2.009	13.393	0.083	0.552	10.410	69.400
NNC-TG1-vcMMA D	Aminocapril-vcMMA D	1.83			7.260	48.400			22.790	151.933	22.990	153.267
7E6-TG1-vcMMA D	Aminocapril-vcMMA D	1.87			0.030	0.197					24.180	161.200
h7E6-SVG-TG1-vcMMA D	Aminocapril-vcMMA D	1.91			0.034	0.229					25.310	168.733
7E6-TG6-AcLys-vc-PABC-PABC-MMAD	AcLys-vc-PABC-MMAD	1.87			0.008	0.053						
MMAD												
7E6-K222R-LCQ3-AcLys-vc-PABC-MMAD	AcLys-vc-PABC-MMAD	0.74			0.008	0.054						
h7E6SVG-TG6-AcLys-vc-PABC-MMAD	AcLys-vc-PABC-MMAD	1.93	0.011	0.072	0.032	0.214			0.209	1.393		
h7E6SVG-K222R-LCQ3-AcLys-vc-PABC-MMAD	AcLys-vc-PABC-MMAD	1.90	0.011	0.07	0.014	0.092			2.681	17.873		

Ejemplo 10: Conjugado de Auristatina 7E6 Anti-Trop-2 Indujo Regresión de Tumor a Largo Plazo en Modelo de Xenoinjerto BxPC3

Los estudios de eficacia *in vivo* de anticuerpo de control
 5 hIgG1-TG1-vcMMAD (“NNCTG1-vcMMAD”) y anticuerpo 7E6 anti-Trop-2 quimérico conjugado con 1) variante LCQ03-AcLys-vc-PABC-MMAD K222R o 2) TG6-AcLys-vc-PABC-MMAD a través de transglutaminasa se efectuaron con el modelo de xenoinjerto BxPC3 que expresa el objetivo. Para el conjugado
 10 variante h7E6-K222R-LCQ03-AcLys-vc-PABC-MMAD, el aminoácido lisina de tipo silvestre en el anticuerpo anti-Trop-2 es sustituido con aminoácido arginina (es decir, K222R) en la posición 222 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat. LCQ03 corresponde a la NO ID SEC:78 (GGLLQGG), y
 15 TG6 corresponde a NO ID SEC:79 (LLQGA). El método general para conjugar los anticuerpos Trop-2 utilizando marcadores de transglutaminasa LCQ03 y TG6 se describió en el Ejemplo 9. Dos millones de células cancerosas BxPC3 fueron implantadas de manera subcutánea en ratones CB17 SCID de 5-8 semanas de edad hasta que los tamaños de tumor alcanzaron
 20 aproximadamente 250 mm³. Los animales fueron aleatorizados por tamaños de tumor y la dosificación se realizó a través de inyección de bolo en la vena de la cola. 3 mg/kg de hIgG1 de control, variante h7E6-K222R-LCQ03-AcLys-vc-PABC-MMAD
 25 quimérico, o 7E6-TG6-AcLys-vc-PABC-MMAD quimérico fueron administrados a través de inyección de bolo en la vena de la cola una vez para un total de 1 dosis. El volumen de tumor fue medido una vez por semana por medio de un dispositivo Caliper y calculado con la siguiente fórmula: Volumen de tumor =
 30 (longitud x anchura²)/2. Se terminaron los estudios antes de que sus volúmenes de tumor alcanzaran 2000 mm³. La dosis individual del anticuerpo 7E6 anti-Trop-2 conjugado con AcLys-vc-PABC-MMAD resultó en la regresión de tumor a largo plazo. Véase la Figura 8.

Ejemplo 11: Citotoxicidad de ADCs Anti-Trop-2 en Células Trop-2 Positivas

Los anticuerpos de control negativo (NNC) y anti-Trop-2 humanizados (h7E6SVG) fueron expresados como subtipos IgG1 humanos modificados genéticamente con marcador marcadores de transglutaminasa que contienen glutamina en el extremo C de la cadena pesada (TG6 (NO ID SEC: 79)), cadena ligera (LCQ03 (NO ID SEC: 78) y LCQ04 (NO ID SEC: 79)) o con mutaciones N297Q/K222R en los dominios CH2/bisagra de cadena pesada y conjugados con AcLys-vc-PABC-0101 ("vc0101" o Acetil-lisina-valina-citrulina-*p*-aminobenciloxicarbonil-(2-metilalanil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1*S*)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida)) o aminocaproil-PEG6 (Propilen Glicol)₆-propionil)-MMAD como se indicó. 2-metilalanil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1*S*)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-*N*-metil-L-valinamida es una auristatina novedosa, como se describe en las Solicitudes de los Estados Unidos Nos: 61/561,255 y 61/676,423. El método para conjugar los anticuerpos Trop-2 utilizando marcadores de transglutaminasa se describe en el Ejemplo 9. Las células que expresan el objetivo o sin expresión (SW620) fueron cultivadas en placas de fondo transparente con paredes blancas a 2000 (A431, BxPC3, NCI-H292, NCI-H1650, MDA-MB-468 y SW620), 2500 (Calu-3) o 3000 (OVCAR3 y SKBR3) células por pozo durante 24 horas antes del tratamiento. Las células fueron tratadas con conjugados anticuerpo-fármaco diluidos serialmente en 4 ocasiones por triplicado. Se determine la viabilidad celular a través de CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay 96 (Promega, Madison, WI) 96 horas después del tratamiento. Se determinó la viabilidad celular como un porcentaje del control, no tratado. Se calculó IC50 por medio del software GraphPad Prism 5 y se expresó como concentración (nM) de Ab total. El Cuadro 13 muestra que los

anticuerpos 7E6 anti-Trop-2 7E6 humanizados conjugados para vc0101 o PEG6-MMAD a través de marcador de transglutaminasa ejercen potente actividad de inactivación celular en las células que expresan Trop-2.

5

Cuadro 13.

Nombre de célula	Tipo de célula	Expresión de Trop-2	h7E6SVG-TG6-vc0101 Ab IC50 (nM)	h7E6SVG-N297Q/K222R-PEG6MAD Ab IC50 (nM)	h7E6SVG-LCQ03/K22R-vc0101 Ab IC50 (nM)	h7E6SVG-LCQ04/K222R-vc0101 Ab IC50 (nM)	NNC-TG6-vc0101 Ab IC50 (nM)	NNC-N297Q/K22R-PEG6MMAD Ab IC50 (nM)
A431	Carcinoma epidermoj de	+++	0.12	0.07	0.03			>267
BxPC3	Adenocar_ cinoma de páncreas	++	0.32	0.03	0.13	0.11		
NCI-H292	Carcinoma pulmonar mucoepi dermoide	++	0.63	0.03		1.84		
Calu-3	Adenocar_ cinoma pulmonar	++	0.53	0.50		1.51		
NCI-H1650	Carcinoma pulmonar-broncoal veolar	++	1.92	0.38			>267	>267
OVCAR3	Adenocar_ cinoma de ovarios	+++	0.56	0.98			168.5	>267
MDA-MB-468	Adenocar_ cinoma Mamario	++	0.77	0.19			>267	>267
SKBR3	Adenocar_ cinoma Mamario	+ / ++	0.42	0.08			200.5	>267
Colo205	Adenocar_ cinoma colorectal	+	32.89	21.15	174.50			
SW620	Adenocar_ cinoma colorectal	-	156.20	>267	>267	>267	>267	>267

Ejemplo 12: Conjugado de 7E6 Auristatina Anti-Trop-2 Indujo Regresión de Tumor en el Modelo de Xenoinjerto BxPC3 de Tumor Pancreático

Se efectuaron los estudios de eficiencia *in vivo* de ADCs anti-Trop2 con el modelo de xenoinjerto BxPC3 que expresa el objetivo. Dos millones de células cancerosas epidermoides A431 fueron implantadas de manera subcutánea en ratones nu/nu de 5-8 semanas de edad hasta que los tamaños de tumor alcanzaron aproximadamente 350. mm³. Los animales fueron aleatorizados por tamaños de tumor y la dosificación se efectuó a través de inyección de bolo en la vena de la cola. 6 mg/kg de anticuerpos anti-Trop2 7E6 quiméricos o 7E6 humanizados (h7E6-WT, h7E6-SVG, h7E6-L, y h7E6-SVGL) conjugados con vcMMAE fueron administrados a través de inyección de bolo en la vena de la cola con una dosis única. El método de conjugación de anticuerpos Trop-2 utilizando marcador de transglutaminasa TG1 (NO ID SEC: 75) en presencia de transglutaminasa se describe en el Ejemplo 9. Se midió el volumen de tumor una vez por semana por medio de un dispositivo Caliper y se calculó con la siguiente fórmula: Volumen de tumor = (longitud x anchura²)/2. Los animales fueron sacrificados antes de que sus volúmenes de tumor alcanzaran 2000 mm³. Se observó regresión de tumor en todos los grupos tratados anti-Trop2 ADC. Figura 9.

Ejemplo 12: Conjugados de Auristatina 7E6 Anti-Trop-2 Indujeron Regresión de Tumor en el Modelo de Xenoinjerto BxPC3 de Tumor Pancreático

Se realizaron estudios de eficacia *in vivo* de anti-Trop2 ADCs con modelo de xenoinjerto BxPC3 que expresa el objetivo. Dos millones de células de cáncer de pancreático BxPC3 fueron implantadas de manera subcutánea en ratones CB17/SCID de 5-8 semanas de edad hasta que los tamaños de tumor alcanzaron entre 300-400 mm³. Los animales fueron aleatorizados por tamaños de tumor y la dosis individual de anticuerpo anti-Trop2 humanizado conjugado con 1) TG6-AcLys-vc-PABC-0101 (equivalente a TG6-

AcLys-vc-0101 como se mostró en la Figura 9A); 2) N297Q/K222R-PEG6-MMAD ((Propilen Glicol)6-propionil-MMAD); y 3) LCQ04-K222R-vc-PABC0101 (equivalente a LCQ04/K222R-vc0101 como se mostró en la Figura 9C); LCQ04
 5 corresponda a No ID SEC: 79 (LLQGA)) y conjugados de control fueron administrados a través de inyección de bolo en la vena de la cola. Se midió el tamaño de tumor una vez por semana por medio de un dispositivo Caliper y se calculó con la siguiente fórmula: Volumen de tumor = (longitud x anchura²)/2.
 10 Se terminaron los estudios antes de que sus volúmenes de tumor alcanzaran 2000 mm³. Las Figuras 9A-9C muestran que una dosis individual del anticuerpo anti-Trop2 humanizado conjugado con 1) TG6-AcLys-vc-PABC-0101; 2) N297Q/K222R-PEG6-MMAD; y 3) LCQ04-K222R-vc-PABC0101 resultaron en
 15 regresión de tumor en el modelo de xenoinjerto BxPC3 de tumor pancreático.

20 Ejemplo 13: Conjugado de Auristatina 7E6 Anti-Trop-2 Indujo Regresión de Tumor en Modelo de Xenoinjerto Colo205 de Tumor Colorectal

Se efectuaron estudios de eficacia *in vivo* del anticuerpo Trop-2 con el modelo de xenoinjerto colo205 que expresa el objetivo. Tres millones de células de cáncer de colon colo205
 25 fueron implantadas de manera subcutánea en ratones nu/nu de 5-8 semanas de edad hasta que los tamaños de tumor alcanzaron aproximadamente 300 mm³. Los animales fueron aleatorizados por tamaños de tumor, y se administró la dosis individual de 6 mg/kg de anticuerpo ant-Trop-2 humanizado
 30 conjugado con 1) TG6-AcLys-vc-PABC-0101 (equivalente a TG6-vc-0101 como se mostró en la Figura 10); y 2) LCQ03-vc-PABC-0101 que tienen sustitución K222R en los dominios bisagra/CH2 de la cadena pesada (equivalente a LCQ03/K222R-vc0101 como se mostró en la Figura10; LCQ03 corresponde a

NO ID SAC: 78 (GGLLQGG)); y el conjugado de control (IgG-vc-PABC-0101) a través de inyección de bolo en la vena de la cola. El volumen de tumor se midió una vez por semana por medio de un dispositivo Caliper y se calculó con la siguiente fórmula: Volumen de tumor = (longitud x anchura²)/2. Los estudios se terminaron antes de que sus volúmenes de tumor alcanzaran 2000 mm³. La Figura 10 muestra que una dosis individual del anticuerpo anti-Trop-2 conjugado con 1) TG6 AcLys-vc-PABC-0101; y 2) LCQ03-vc-PABC-0101 que tiene sustitución K222R en los dominios de bisagra/CH2 de la cadena pesada dio como resultado la regresión del tumor en el modelo de xenoinjerto Colo205 de tumor colorectal.

Ejemplo 14: Conjugado de 7E6 Auristatina Anti-Trop-2 Indujo Regresión de Tumor en Modelo de Xenoinjerto PDX Ova196756 de Ovario

Se efectuaron estudios de eficacia *in vivo* de ADC Trop-2 usando anticuerpo anti-Trop2 humanizado (h7E6SVG) conjugado con TG6-vc-0101 con modelo de xenoinjerto derivado de paciente con cáncer de ovario que expresa el objetivo (PDX Ova196756). Esta muestra de tumor se derivó a partir de un espécimen quirúrgico y se propagó en ratones NSG (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine). Para estudios de eficacia, aproximadamente 1-2 mm³ de fragmentos de tumor fueron implantados de manera subcutánea dentro de los flancos laterales de ratones CB17/SCID. Los animales fueron aleatorizados por tamaños de tumor una vez que alcanzaron ~400 mm³, y se administró una dosis individual de h7E6SVG-TG6-AcLys-vc-PABC-0101 (0.75 mg/kg y 1.5 mg/kg; equivalente a TG6-vc0101 como se mostró en la Figura 11) y el conjugado de control (1.5 mg/kg; IgG-vc-PABC-0101 o IgG-vc0101 como se mostró en la Figura 11) a través de inyección de bolo en la vena de la cola. El volumen de tumor se midió una vez por semana por medio de un dispositivo Caliper y se calculó con la siguiente fórmula: Volumen de tumor = (longitud x anchura²)/2. Los estudios se terminaron antes de que sus volúmenes de tumor alcanzaran 2000 mm³. La Figura 11 muestra que

la dosis individual del anticuerpo anti-Trop2 humanizado conjugado con TG6-AcLys-vc-PABC-0101 resultó en la regresión de tumor en el modelo de xenoinjerto PDX Ova196756 de cáncer de ovario.

5 Ejemplo 15: El Conjugado de 7E6 Auristatina Anti-Trop-2 Muestra Eficacia Superior que Gemcitabine para Inducir Regresión de Tumor en Modelo PDX Pancreático Pan0146

Se efectuaron estudios de eficacia *in vivo* de ADC Trop-2 usando anticuerpo anti-Trop2 humanizado (h7E6SVG) conjugado con
 10 TG6-vc0101 con modelo de xenoinjerto derivado de paciente con cáncer pancreático que expresa el objetivo (PDX Pan0146) a partir de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). Para los estudios de eficacia, 1-2 mm³ de fragmentos de tumor fueron implantados de manera subcutánea dentro de los flancos laterales de los animales.
 15 Los animales fueron aleatorizados por tamaños de tumor una vez que alcanzaron ~300 mm³, y h7E6SVG-TG6-AcLys-vc-PABC-0101 y el conjugado de control fueron administrados a través de inyección de bolo en la vena de la cola. Figura 12A: Dosis individual de h7E6SVG-TG6-AcLys-vc-PABC-0101 (mostrado como h7E6SVG-TG6-vc0101 en
 20 la Figura) y el conjugado de control fueron suministrados en las dosis indicadas. Se suministró Gemcitabine a 75 mg/kg dos veces por semana para un total de 6 dosis. Figura 12B: se suministró h7E6SVG-TG6-AcLys-vc-PABC-0101 a 0.75 mg/kg semanalmente para 4 dosis, 1.5 mg/kg cada dos semanas para dos dosis o 3.0
 25 mg/kg dosis individual. Se suministró Gemcitabine una vez por semana a 75 mg/kg para 4 dosis. El volumen de tumor se midió una vez por semana por medio de un dispositivo Caliper y se calculó con la siguiente fórmula: Volumen de tumor = (longitud x anchura²)/2. Los estudios se terminaron antes de que sus volúmenes de tumor
 30 alcanzaran 2000 mm³. Los datos muestran que el anticuerpo anti-Trop2 humanizado conjugado con TG6-AcLys-vc-PABC-0101 tiene eficacia superior a gemcitabine para inducir la regresión de tumor en el modelo PDX pancreático Pan0146 y que la dosificación continua de h7E6SVG-TG6-AcLys-vc-PABC-0101 resultó en la regresión de

tumor sostenida en el modelo de xenoinjerto PDX pancreático Pan0146.

Ejemplo 16: Conjugado de 7E6 de Auristatina Anti-Trop-2 Induce
Regresión de Tumor en Modelo PDX Pan144607 Pancreático

Se efectuaron estudios *in vivo* de Trop-2 ADC usando anticuerpo anti-Trop-2 humanizado (h7E6SVG) conjugado con vc0101 o PEG6MMAD con el modelo de xenoinjerto derivado de paciente con cáncer pancreático que expresa el objetivo (PDX Pan144607). Esta muestra se tumor se derivó a partir de un espécimen quirúrgico y se propagó en ratones NSG (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine). Para los estudios de eficacia, 1-2 mm³ de fragmentos de tumor fueron implantados de manera subcutánea dentro de los flancos laterales de ratones CB17/SCID. Los animales fueron aleatorizados por tamaños de tumor una vez que alcanzaron ~300 mm³, se administró una dosis individual de 1.5, 3.0 y 6.0 mg/kg h7E6SVG-N297Q/K222R-PEG6MMAD y el conjugado de control a través de inyección de bolo en la vena de la cola. El volumen de tumor se midió una vez por semana por medio de un dispositivo Caliper y se calculó con la siguiente fórmula: Volumen de tumor = (longitud x anchura²)/2. Se terminaron los estudios antes de que sus volúmenes de tumor alcanzaran 2000 mm³. La Figura 13 muestra que una dosis individual del anticuerpo anti-Trop2 humanizado conjugado con PEG6-MMAD resultó en la regresión de tumor en el modelo PDX Pan144607 pancreático.

Ejemplo 17: Conjugado de 7E6 de Auristatina Anti-Trop-2 Induce
Regresión de Tumor en el Modelo PDX Pan0135 Pancreático

Se efectuaron estudios *in vivo* de Trop-2 ADC usando anticuerpo anti-Trop-2 humanizado (h7E6SVG) conjugado con PEG6MMAD con modelo de xenoinjerto derivado de paciente con cáncer pancreático que expresa el objetivo (PDX Pan0135) a partir de Jackson Laboratories. Para los estudios de eficacia, 1-2 mm³ de fragmentos de tumor fueron implantados de manera subcutánea

dentro de los flancos laterales de los animales. Los animales fueron aleatorizados por tamaños de tumor una vez que alcanzaron $\sim 300 \text{ mm}^3$ y se administraron 6mg/kg de h7E6SVG-N297Q/K222R-PEG6MMAD y el conjugado de control a través de inyección de bolo en la vena de la cola con dosis individual. El volumen de tumor se midió una vez por semana por medio de un dispositivo Caliper y se calculó con la siguiente fórmula: Volumen de tumor = (longitud x anchura²)/2. Los estudios se terminaron antes de que sus volúmenes de tumor alcanzaran 2000 mm^3 . La Figura 14 muestra que una dosis individual del anticuerpo anti-Trop2 humanizado conjugado con PEG6-MMAD resultó en la regresión de tumor en el modelo PDX Pan0135 pancreático.

Ejemplo 18: Determinación de Afinidad de Enlace de Anticuerpo para Anticuerpos Anti-Trop-2 Humanizados

Se realizó el análisis de las interacciones Fab/human Trop2-ECD (Dominio Extracelular) utilizando un biosensor de Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR) Bio-Rad Proteon XPR36 (Bio-Rad, Hercules, CA) equipado con un microcircuito sensor GLC. La temperatura de ensayo fue de 25°C , y la solución reguladora de pH del ensayo fue 10 mM Fosfato de Sodio, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.4. Se prepare una disposición de Fabs amine-acopladas utilizando la metodología descrita en Abdiche et al. (Anal. Biochem., 411:139-151 (2011)). En cada ciclo de análisis, el antígeno Trop2-ECD humano monovalente se hizo fluir a $30 \mu\text{L}/\text{min}$ sobre las Fabs inmovilizadas durante 3 minutos seguido por un lavado con solución reguladora de pH durante 15 minutos a fin de monitorear la disociación del complejo Fab/Trop2. La superficie de sensor fue regenerada entre los ciclos de análisis, utilizando tres inyecciones de 18-segundos de una mezcla 2:1 (en volumen) de solución reguladora de Elución IgG Pierce: 4 M NaCl (Pierce, Rockford, IL). Se repitieron los ciclos de enlace y regeneración en concentraciones de Trop2-ECD humano de 6, 30 y 150 nM. Los datos resultantes se ajustaron para un modelo de enlace Langmuir 1:1 utilizando el

software de evaluación Proteon. Los resultados aparecen el siguiente cuadro.

Cuadro 14

Secuencia	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	K_D (nM)
DG (h7E6_SVG)	1.7E+05	6.9E-04	17	4.1
DK (h7E6_SVG20)	< 1.7E+05	1.3E-02	0.88	> 75
DA (h7E6_SVG22)	< 1.8E+05	1.3E-02	0.86	> 75
DL (h7E6_SVG28)	< 2.1E+05	1.6E-02	0.72	> 75
DE (h7E6_SVG30)	< 8.5E+05	6.4E-02	0.18	> 75
DS (h7E6_SVG19)	< 6.0E+05	4.5E-02	0.26	> 75

5

Aunque las enseñanzas se han descrito con referencia a varias aplicaciones, métodos, equipos, y composiciones, se apreciará que se pueden hacer varios cambios y modificaciones sin apartarse de las enseñanzas de la presente y la invención reivindicada a continuación. Los ejemplos anteriores se proporcionaron para ilustrar mejor las enseñanzas descritas y no pretenden limitar el alcance de las enseñanzas aquí presentadas. En tanto que las actuales enseñanzas se han descrito en términos de estas modalidades ilustrativas, el técnico experimentado comprenderá con facilidad que son posibles numerosas variaciones y modificaciones de estas modalidades ilustrativas sin experimentación indebida. Todas esas variaciones y modificaciones están dentro del alcance de las actuales enseñanzas.

Todas las referencias aquí citadas, incluyendo patentes, solicitudes de patente, documentos, libros de texto, y similares, y las referencias citadas en ellas, hasta el grado en que no lo estén ya, se encuentran incorporadas mediante referencia en su totalidad. En el caso de que una o más de la literatura incorporada y materiales similares difieran de o contradigan esta solicitud, incluyendo, aunque

20

sin limitación a términos definidos, uso de término, técnicas descritas, o similares, prevalecerá esta solicitud.

La descripción y Ejemplos anteriores detallan ciertas modalidades específicas de la invención y describen el mejor
5 modo contemplado por los inventores. Sin embargo, se apreciará que, sin importar cuan detallado pueda parecer lo anterior en el texto, la invención puede ser llevada a la práctica de varias maneras y la invención será interpretada de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y cualesquiera
10 equivalentes de las mismas.

15

20

25

30

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, que se enlaza de manera específica un antígeno de superficie celular de trofoblasto-2 (Trop-2), en donde el anticuerpo comprende

(a) una región variable de cadena pesada (VH) complementaria que determina regiones que comprenden (i) una región de determinación complementaria VH (CDR1) que comprende la secuencia SYGVH (NO ID SEC: 30), GGSISSY (NO ID SEC: 36), o GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37); (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia VIW₁TX₁GX₂TDYNSALMX₃, en donde X₁ es G o S; X₂ es S o V; X₃ es S o G (NO ID SEC: 49), o WTX₁GX₂ en donde X₁ es G o S, X₂ es S o V (NO ID SEC: 50); y (iii) un CDR3 VH que comprende la secuencia DYDRYTX₁DY, en donde X₁ es E o M (NO ID SEC: 82); y/o

(b) una región variable de cadena ligera (VL) complementaria que determina regiones que comprenden (i) una CDR1 VL que comprende la secuencia RASKSVSTSX₁YSYMH, en donde X₁ es G, L, o N (NO ID SEC: 63); (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia LASNLES (NO ID SEC: 55); y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia QHSRELPYT (NO ID SEC: 56);

2. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, que se enlaza de manera específica a Trop-2, en donde el anticuerpo comprende:

una región VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en NO ID SEC: 5 u 85; y/o

una región VL que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en NO ID SEC: 3 o 6.

3. El anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la región VH comprende (i) una CDR1 VH que comprende la secuencia SYGVH (NO ID SEC: 30), GGSISSY (NO ID SEC: 36), o GGSISSYGVH (NO ID SEC: 37); (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia VIW₁TSGVTDYNSALMG (NO ID SEC: 38) o WTSGV (NO ID SEC: 39); y

(iii) una CDR3 VH que comprende la secuencia DGDYDRYTMDY (NO ID SEC: 35), DYDRYTMDY (NO ID SEC: 99), o DYDRYTEDY (NO ID SEC: 100).

4. El anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la región VL comprende (i) una CDR1 VL que comprende la secuencia RASKSVSTSGYSYMH (NO ID SEC: 54) o RASKSVSTSLYSYMH (NO ID SEC: 57); (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia LASNLES (NO ID SEC: 55); y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia QHSRELPYT (NO ID SEC: 56).

5. El anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque la región VH comprende la secuencia mostrada en NO ID SEC: 5, 85 o una variante con una o varias sustituciones aminoácido conservadoras en residuos que no están dentro de una CDR y/o la región VL comprende la secuencia de aminoácido mostrada en NO ID SEC: 3, 6 o una variante de la misma con una o varias sustituciones aminoácido en aminoácidos que no están dentro de una CDR.

6. El anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno de conformidad con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia mostrada en NO ID SEC: 66 y una cadena pesada que comprende la secuencia mostrada en NO ID SEC: 65 O 102.

7. El anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el anticuerpo comprende una región VH producida por el vector de expresión con No. de Acceso ATCC PTA-12872.

8. El anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el anticuerpo comprende una región VL producida por medio del vector de expresión con No de Acceso ATCC PTA-12871.

9. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de enlace de

antígeno del mismo, que se enlaza de manera específica un dominio 3 y un dominio 4 de Trop-2 humano (NO ID SEC: 27) con una afinidad de enlace de anticuerpo monovalente (K_D) de aproximadamente 6.5 nM o menos como se mide a través de resonancia plasmónica de superficie.

10. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, que se enlaza de manera específica a Trop-2, en donde el anticuerpo comprende

(a) una región variable de cadena pesada (VH) complementaria que determina regiones que comprenden (i) una región de determinación complementaria VH (CDR1) que comprende la secuencia SYWIN (NO ID SEC: 40), GYTFTSY (NO ID SEC: 41), o GYTFTSYWIN (NO ID SEC: 42); (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia NIX₁PSDSYSN₂YX₂KFKD en donde X₁ es Y o F; X₂ es Q o K, o X₁PSDSY en donde X₁ es Y o F (NO ID SEC: 52); y (iii) una CDR3 VH que comprende la secuencia GSX₁FDY en donde X₁ es S o G (NO ID SEC: 53); y/o

(b) una región variable de cadena ligera (VL) complementaria que determina regiones que comprenden (i) una CDR1 VL que comprende la secuencia RASQTIGTSIH (NO ID SEC: 59); (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia YASESIS (NO ID SEC: 60); y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia X₁QX₂SWPFT en donde X₁ es Q o S; X₂ es N o F (NO ID SEC: 64).

11. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, que se enlaza de manera específica a Trop-2, en donde el anticuerpo comprende:

una región VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en NO ID SEC: 13; y/o

una región VL que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en NO ID SEC: 12.

12. El anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la región VH comprende (i) una CDR1 VH que comprende la secuencia SYWIN (NO ID SEC: 40), GYTFTSY (NO ID SEC: 41), o GYTFTSYWIN (NO ID

SEC: 42); (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia NIFPSDSYSNKNKKFKD (NO ID SEC: 46) o FPSDSY (NO ID SEC: 47); y (iii) una CDR3 VH que comprende la secuencia GSGFDY (NO ID SEC: 48).

5 13. El anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la región VL comprende (i) un CDR1 VL que comprende la secuencia RASQTIGTSIH (NO ID SEC: 59); (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia YASESIS (NO ID SEC: 60); y (iii)
10 una CDR3 VL que comprende la secuencia SQSFSPWFT (NO ID SEC: 62).

 14. El anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque la región VH comprende la secuencia mostrada en NO ID SEC: 13
15 o una variante con una o más sustituciones aminoácido conservadora en residuos que no están dentro de una CDR y/o la región VL comprende la secuencia de aminoácido mostrada en NO ID SEC: 12 o una variante del mismo con una o varias sustituciones aminoácido en aminoácidos que no están dentro
20 de una CDR.

 15. El anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia mostrada en NO ID SEC: 68 y una cadena pesada
25 que comprende la secuencia mostrada en NO ID SEC: 67.

 16. Un anticuerpo aislado que se enlaza de manera específica a Trop-2 y compite con el anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2 o 4.

 17. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 16,
30 caracterizado porque el anticuerpo tiene una afinidad de enlace (KD) de aproximadamente 6.5 nM o menos como se mide a través de resonancia plasmónica de superficie.

 18. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, caracterizado porque el anticuerpo

comprende un marcador que contiene glutamina donador de acilo modificado genéticamente en un sitio específico.

19. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el marcador comprende una secuencia aminoácido GLLQGG (NO ID SEC: 78), LLQGA (NO ID SEC: 79) o LLQ.

20. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque el anticuerpo comprende además una modificación aminoácido en la posición 222, 340, o 370.

21. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque la modificación aminoácido es una sustitución a partir de lisina a arginina.

22. Un conjugado del anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15 y 18-21, caracterizado porque el anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno es conjugado para un agente, en donde el agente es seleccionado a partir del grupo que consta de un agente citotóxico, un agente inmunomodulador, un agente trazador para diagnóstico por imágenes, una proteína terapéutica, un biopolímero, y un oligonucleótido.

23. El conjugado de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque el agente es un agente citotóxico.

24. El conjugado de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el agente citotóxico es MMAD (Monometil Auristatina D) o 0101 (2-metilalanil-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1*S*)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-yl)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-metil-L-valinamida).

25. El conjugado de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado por que el conjugado comprende la fórmula anticuerpo-(marcador que contiene glutamina donador de acilo)-(ligador)-(agente citotóxico).

26. El conjugado de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el marcador que contiene glutamina donador de

acilo comprende una secuencia de aminoácido GGLLQGG (NO ID SEC: 78), LLQGA (NO ID SEC: 79), LLQ, o LLQX₁X₂X₃X₄X₅, en donde X₁ es G o P, en donde X₂ es A, G, P, o está ausente, en donde X₃ es A, G, K, P, o está ausente, en donde X₄ es G, K, o está ausente, y en donde X₅ es K o está ausente (NO ID SEC: 88), y en donde el ligador comprende acetil-lisina-valina-citrulina-*p*-aminobenciloxicarbonilo o amino-PEG6-propionilo.

27. El conjugado de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el conjugado es seleccionado a partir del grupo que comprende 1) anticuerpo-LLQGA (NO ID SEC: 79)-(acetil-lisina-valina-citrulina-*p*-aminobenciloxicarbonilo (AcLys-VC-PABC))-0101; 2) anticuerpo-LLQGA (NO ID SEC: 79)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD; 3) anticuerpo-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (NO ID SEC: 88)-(AcLys-VC-PABC)-0101; 4) anticuerpo-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (NO ID SEC: 88)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD; 5) anticuerpo-GGLLQGG (NO ID SEC: 78)-(AcLys-VC-PABC)-0101; y 6) anticuerpo-GGLLQGG (NO ID SEC: 78)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD.

28. El conjugado de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el conjugado 1) anticuerpo-GGLLQGG (NO ID SEC: 78)-(AcLys-VC-PABC)-0101; 2) anticuerpo-GGLLQGG (NO ID SEC: 78)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD; 3) anticuerpo-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (NO ID SEC: 88)-(AcLys-VC-PABC)-0101; 4) anticuerpo-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (NO ID SEC: 88)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD; 5) anticuerpo-LLQGA (NO ID SEC: 79)-(AcLys-VC-PABC)-0101; o 6) anticuerpo-LLQGA (NO ID SEC: 79)-AcLys-VC-PABC-MMAD comprende una sustitución aminoácido a partir de lisina a arginina en la posición 222.

29. El conjugado de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el conjugado 1) anticuerpo-LLQGA (NO ID SEC: 79)-(AcLys-VC-PABC)-0101; 2) anticuerpo-LLQGA (NO ID SEC: 79)-AcLys-VC-PABC-MMAD; 3) anticuerpo-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (NO ID SEC: 88)-(AcLys-VC-PABC)-0101; o 4) anticuerpo-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (NO ID SEC: 88)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD, en

donde el aminoácido lisina en el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo es eliminado.

30. El conjugado de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el conjugado comprende sustituciones
5 aminoácido en la posición N297Q y K222R, un ligador que comprende amino-PEG6-propionilo, y un agente citotóxico que comprende MMAD.

31. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad
10 terapéuticamente efectiva del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15 o el conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 22-30 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

32. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de
15 nucleótido que codifica el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

33. Un vector que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 32.

34. Una célula huésped aislada que produce de manera
20 recombinante el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

35. Un método para producir un anticuerpo, que comprende cultivar la célula huésped de conformidad con la reivindicación 34 bajo condiciones que resultan en la producción del anticuerpo, y el aislamiento del anticuerpo de la célula huésped o el cultivo.

25 36. Un método para tratar una condición asociada con la expresión de Trop-2 en un sujeto que comprende administrar a un sujeto que necesita de la misma una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 31.

30 37. El método de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado porque la condición es un cáncer.

38. El método de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque el cáncer es seleccionado a partir del grupo que consta de cáncer de vejiga, de mama, cervical, coriocarcinoma, de colon, esofágico, gástrico, glioblastoma, de cabeza y cuello, de

riñón, pulmonar, oral, de ovarios, pancreático, de próstata, y de la piel.

39. Un método para inhibir el crecimiento o la progresión de crecimiento de tumor en un sujeto que tiene un tumor que
5 expresa Trop-2, que comprende administrar a un sujeto que necesita de la misma una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 31 al sujeto.

40. Un método para inhibir la metástasis de células cancerosas que expresan Trop-2 en un sujeto, que comprende
10 administrar a un sujeto que necesita de la misma, una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 31 al sujeto.

41. Un método para inducir la regresión de tumor en un sujeto que tiene un tumor que expresa Trop-2, que comprende
15 administrar a un sujeto que necesita de la misma una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 31 al sujeto.

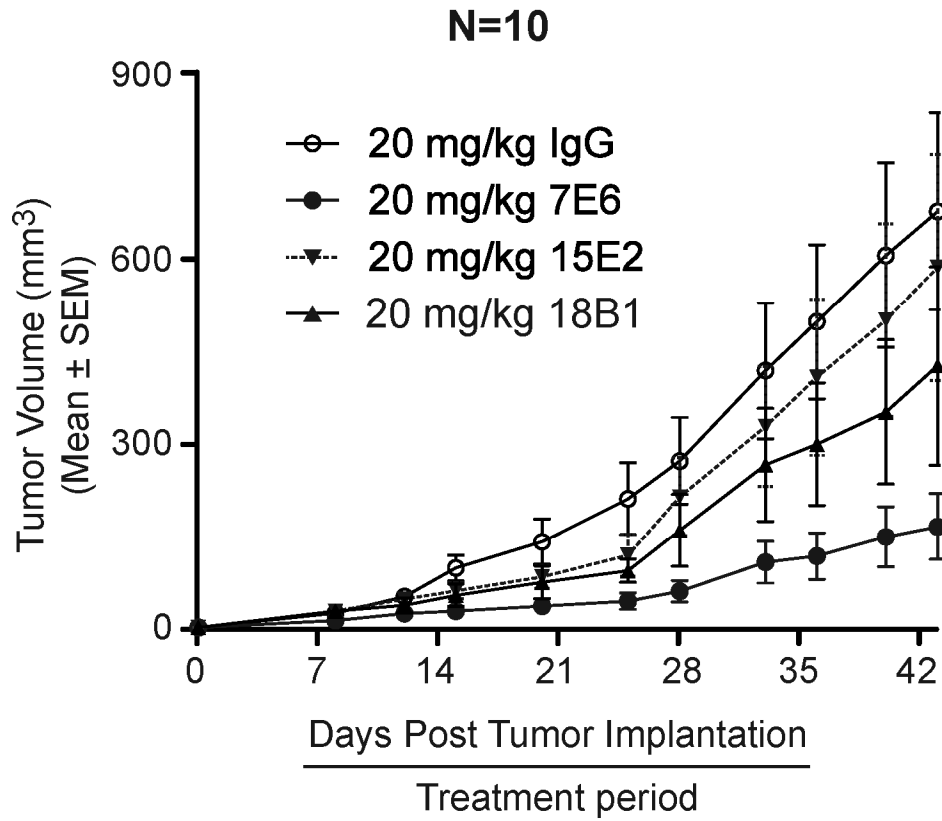
20

25

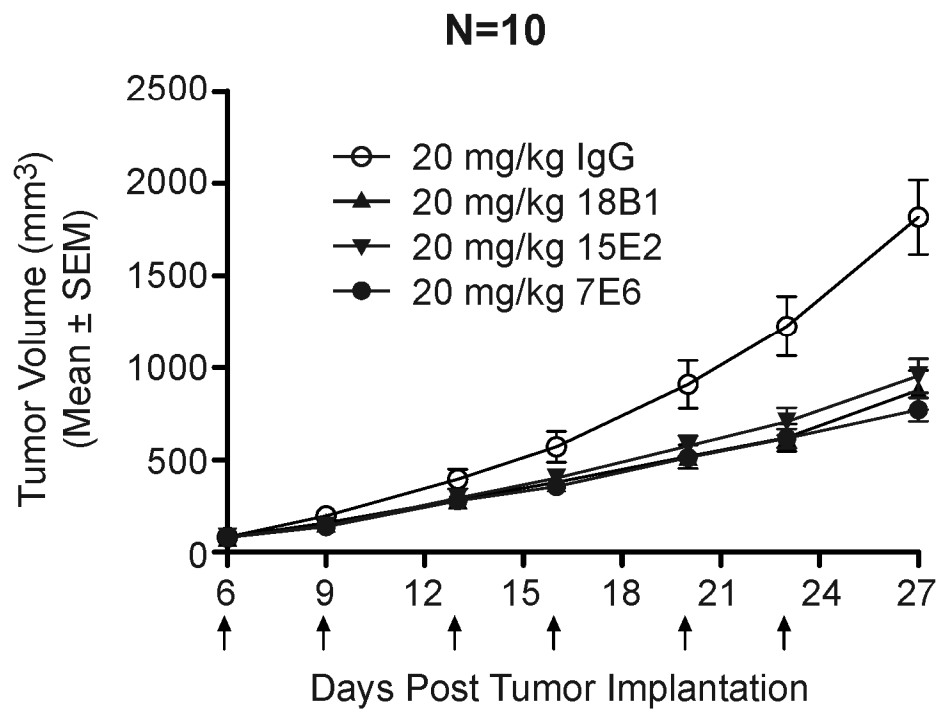
30

RESUMEN

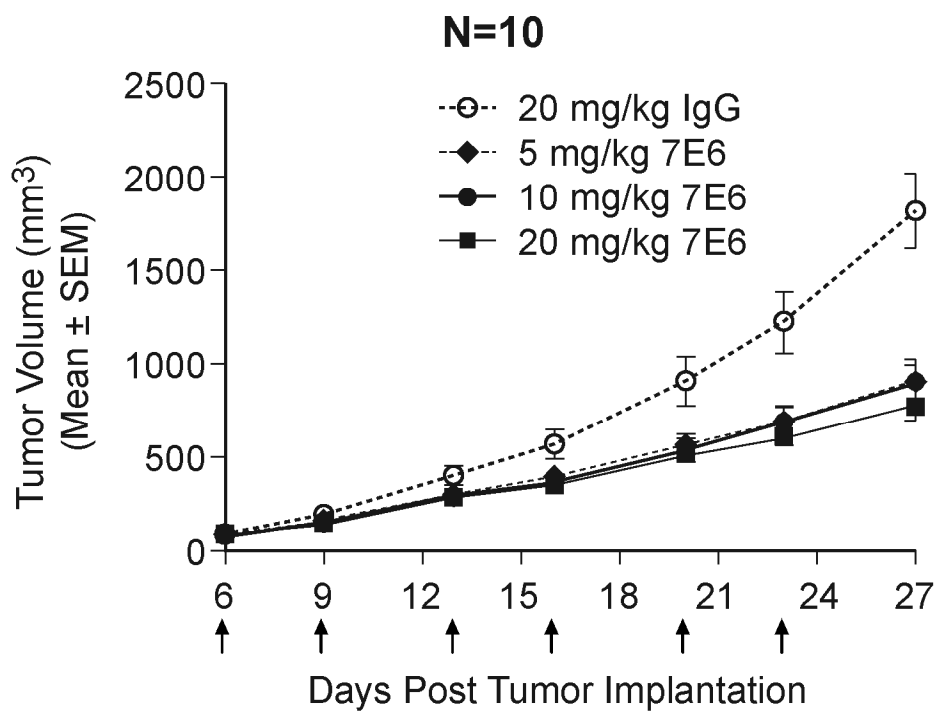
La presente invención proporciona anticuerpos que se enlazan de manera específica a antígeno-2 de superficie celular de trofoblasto (Trop-2). La invención proporciona además conjugados de anticuerpo que comprenden dichos anticuerpos, anticuerpo que codifica ácidos nucleicos, y métodos para obtener dichos anticuerpos. La invención se refiere además a métodos terapéuticos para uso de estos anticuerpos y conjugados Trop-2 de anticuerpo para el tratamiento de una condición asociada con expresión de Trop-2 (por ejemplo, cáncer), tal como cáncer de colon, esofágico, gástrico, de cabeza y cuello, pulmonar, de ovarios, o cáncer pancreático.

Figure 1

antibody treatment	Mean tumor volume (mm ³) on day 43	TGI (Tumor growth inhibition)
control IgG	673.0	0%
7E6	163.8	76%
15E2	582.0	14%
18B1	423.5	37%

Figure 2A

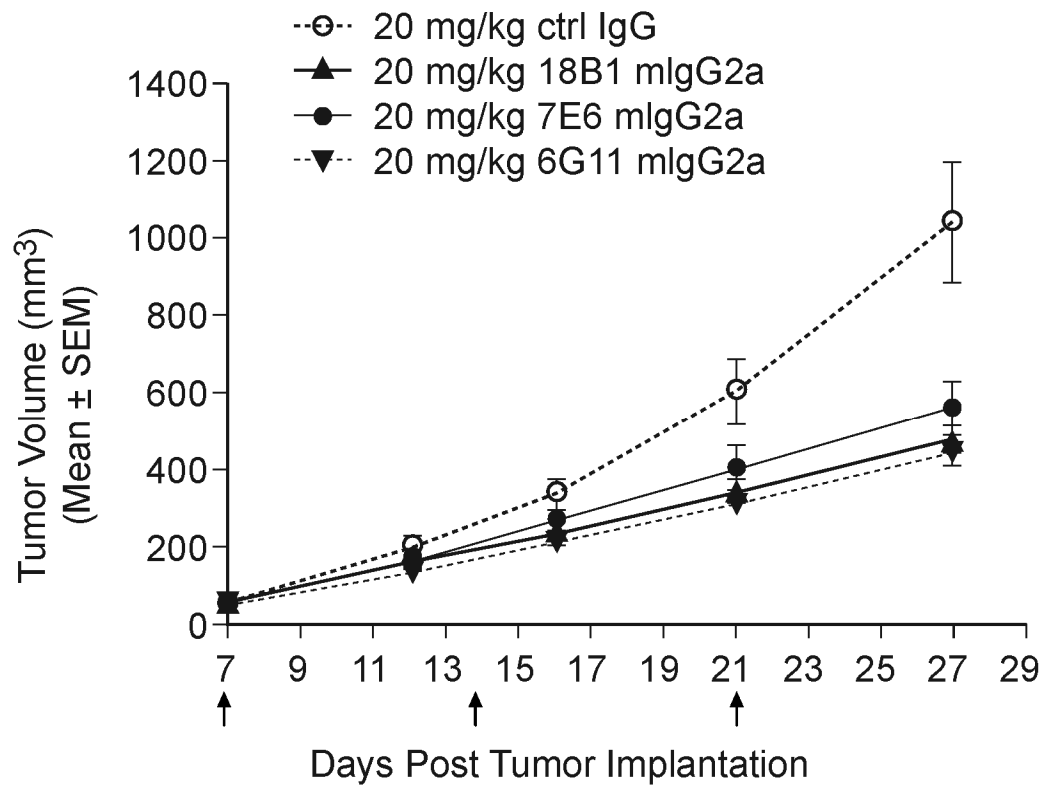
antibody treatment	Mean tumor volume (mm ³) on day 27	TGI (Tumor growth inhibition)
control IgG	1814.8	0%
7E6	770.7	58%
15E2	953.6	47%
18B1	875.5	52%

Figure 2B

antibody treatment	Mean tumor volume (mm ³) on day 27	TGI (Tumor growth inhibition)
control IgG	1814.8	0%
7E6-5mg/kg	913.9	50%
7E6-10mg/kg	897.7	51%
7E6-20mg/kg	875.5	52%

Figure 2C

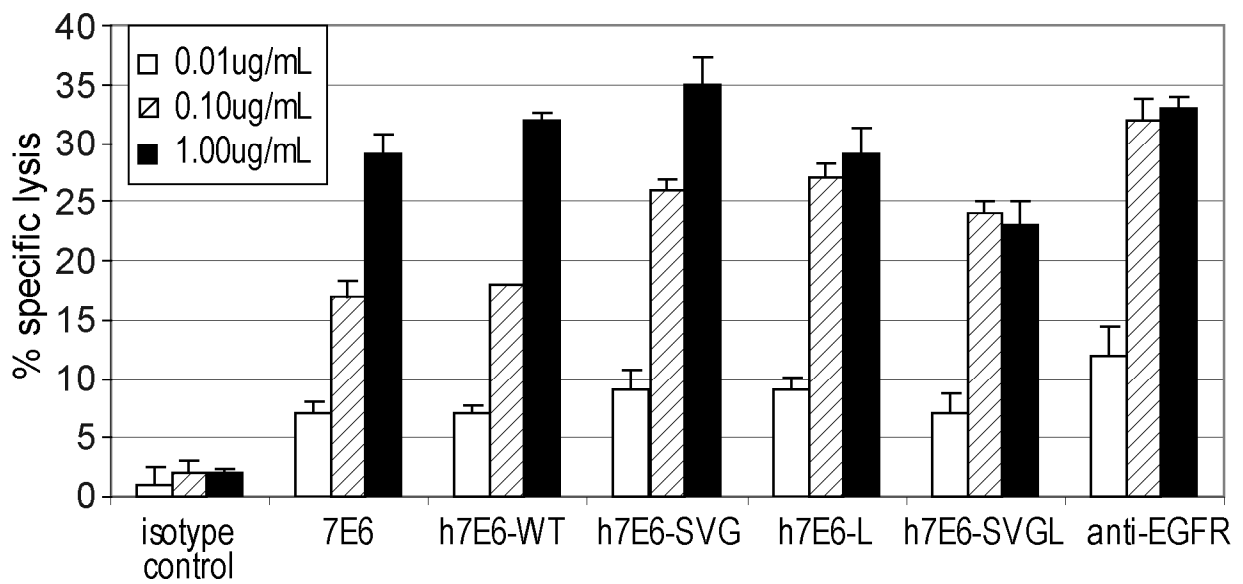
N=10



antibody treatment	Mean tumor volume (mm3) on day 27	TGI (Tumor growth inhibition)
control IgG	1044.0	0%
6G11	444.8	57%
7E6	561.0	46%
18B1	477.6	54%

Figure 3

antibody	% specific lysis		
	0.01ug/mL	0.10ug/mL	1.00ug/mL
isotope control	1 ± 1.6	2 ± 1.0	2 ± 0.4
7E6	7 ± 1.1	17 ± 1.4	29 ± 1.8
h7E6-WT	7 ± 0.8	18 ± 0.0	32 ± 0.6
h7E6-SVG	9 ± 1.7	26 ± 0.9	35 ± 2.3
h7E6-L	9 ± 1.1	27 ± 1.3	29 ± 2.3
h7E6-SVGL	7 ± 1.8	24 ± 1.0	23 ± 2.1
anti-EGFR	12 ± 2.4	32 ± 1.7	33 ± 0.9

ADCC activity of anti-human Trop2 Abs on A431 cells

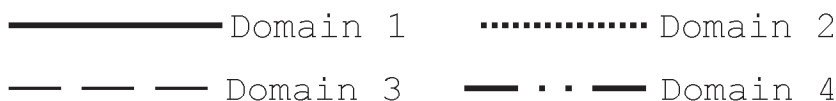


Figure 5

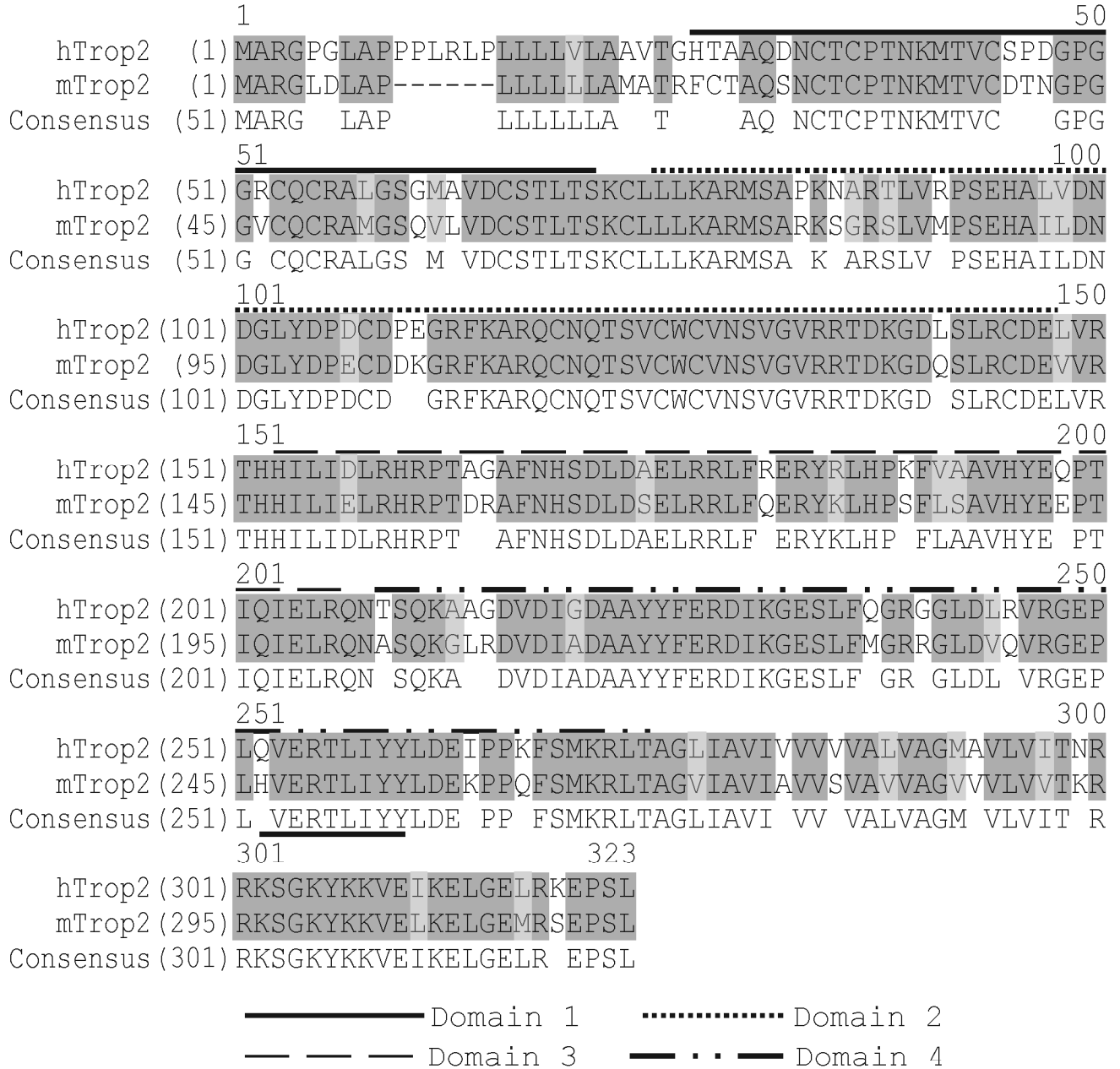


Figure 6A

		1		46
h7E6_VH	(1)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYGVHWIRQPPGKGLE		
h7E6_VH_SVG	(1)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYGVHWIRQPPGKGLE		
m7E6_VH	(1)	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLE		
Consensus	(1)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYGVHWIRQPPGKGLE		
		47		96
h7E6_VH	(47)	WIGVIWTGGSTDYNSALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA		
h7E6_VH_SVG	(47)	WIGVIWTSGVTDYNSALMGRISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA		
m7E6_VH	(47)	WLGVIWTGGSTDYNSALMSRSLINKDNSKSVFLKMNSLQTD	DTAMYYCA	
Consensus	(47)	WIGVIWTGGSTDYNSALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA		
		97		119
h7E6_VH	(97)	RDGDYDRYTMDYWGQGTILVTVSS		
h7E6_VH_SVG	(97)	RDGDYDRYTMDYWGQGTILVTVSS		
m7E6_VH	(97)	RDGDYDRYTMDYWGQGTISVTVSS		
Consensus	(97)	RDGDYDRYTMDYWGQGTILVTVSS		

Figure 6B

		1		46
h7E6_VL	(1)	DIVMTQSPDSLAVSLG	ERATINCRASKSVSTSG	YSYMHWYQQKPGQ
h7E6_VL_L	(1)	DIVMTQSPDSLAVSLG	ERATINCRASKSVSTSL	YSYMHWYQQKPGQ
h7E6_VL_N	(1)	DIVMTQSPDSLAVSLG	ERATINCRASKSVSTSN	YSYMHWYQQKPGQ
m7E6_VL	(1)	DIVLTQSPASLAVSLG	QRATISCRASKSVSTSG	YSYMHWYQQKPGQ
Consensus	(1)	DIVMTQSPDSLAVSLG	ERATINCRASKSVSTSG	YSYMHWYQQKPGQ
		47		96
h7E6_VL	(47)	PPKLLIYLASNLESGVP	DRFSGSGSGTDFTLT	ISSLAEDVAVYYCQHSR
h7E6_VL_L	(47)	PPKLLIYLASNLESGVP	DRFSGSGSGTDFTLT	ISSLAEDVAVYYCQHSR
h7E6_VL_N	(47)	PPKLLIYLASNLESGVP	DRFSGSGSGTDFTLT	ISSLAEDVAVYYCQHSR
m7E6_VL	(47)	PPKLLIYLASNLESGVP	ARFSGSGSGTDFTLN	IHPVEEEDAATYYCQHSR
Consensus	(47)	PPKLLIYLASNLESGVP	DRFSGSGSGTDFTLT	ISSLAEDVAVYYCQHSR
		97		111
h7E6_VL	(97)	ELPYTFGQGTKLEIK		
h7E6_VL_L	(97)	ELPYTFGQGTKLEIK		
h7E6_VL_N	(97)	ELPYTFGQGTKLEIK		
m7E6_VL	(97)	ELPYTFGGGTKLEIK		
Consensus	(97)	ELPYTFGQGTKLEIK		

Figure 7A

		1		46
h6G11_VH	(1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLE		
h6G11_VH_FKG	(1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLE		
m6G11_VH	(1)	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPQHGLE		
Consensus	(1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLE		
		47		96
h6G11_VH	(47)	WMGNIYPSDSYSNYNQKFKDRVMTTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYC		
h6G11_VH_FKG	(47)	WMGNIFPSDSYSNYNKKFKDRVMTTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYC		
m6G11_VH	(47)	WIGNIYPSDSYSNYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMOVSSPTSEDSAVYYC		
Consensus	(47)	WMGNIYPSDSYSNYNQKFKDRVMTTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYC		
		97		115
h6G11_VH	(97)	ARGSSFDYWGQGTLLVTVSS		
h6G11_VH_FKG	(97)	ARGSGFDYWGQGTLLVTVSS		
m6G11_VH	(97)	TYGSSFDYWGQGTLLVTVSS		
Consensus	(97)	ARGSSFDYWGQGTLLVTVSS		

Figure 7B

		1		46
h6G11_VL	(1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTIGTSTIHWYQQKPGQAPRL		
h6G11_VL_SF	(1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTIGTSTIHWYQQKPGQAPRL		
m6G11_VL	(1)	DILLTQSPAILSVSPGERVSEFSCRASQTIGTSTIHWYQQRTNGSPRL		
Consensus	(1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTIGTSTIHWYQQKPGQAPRL		
		47		96
h6G11_VL	(47)	LIYYASESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQSN ~~SWPF~~		
h6G11_VL_SF	(47)	LIYYASESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQSFS ~~SWPF~~		
m6G11_VL	(47)	LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSEVEDIADYYCQQSN ~~SWPF~~		
Consensus	(47)	LIYYASESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQSN ~~SWPF~~		
		97		107
h6G11_VL	(97)	TFGQGTKLEIK		
h6G11_VL_SF	(97)	TFGQGTKLEIK		
m6G11_VL	(97)	TFGSGTKLEIK		
Consensus	(97)	TFGQGTKLEIK		

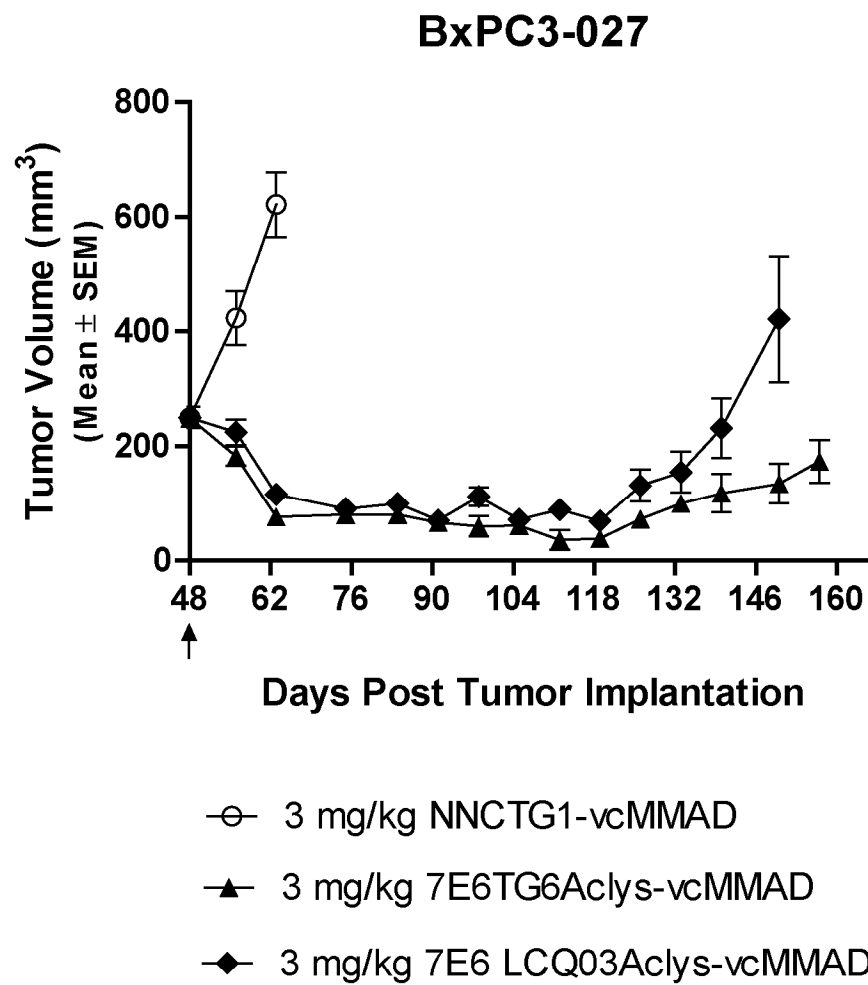
Figure 8

Figure 9A

Anti-Trop2 ADC h7E6SVG-TG6-vc0101 induces tumor regression in BxPC3 model

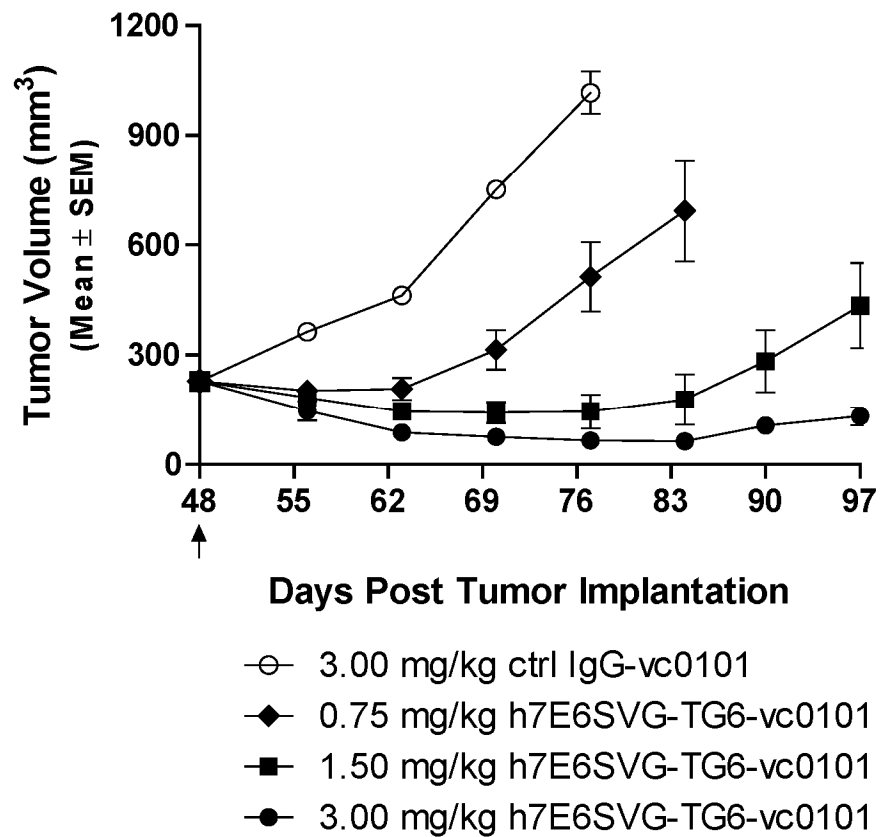


Figure 9B

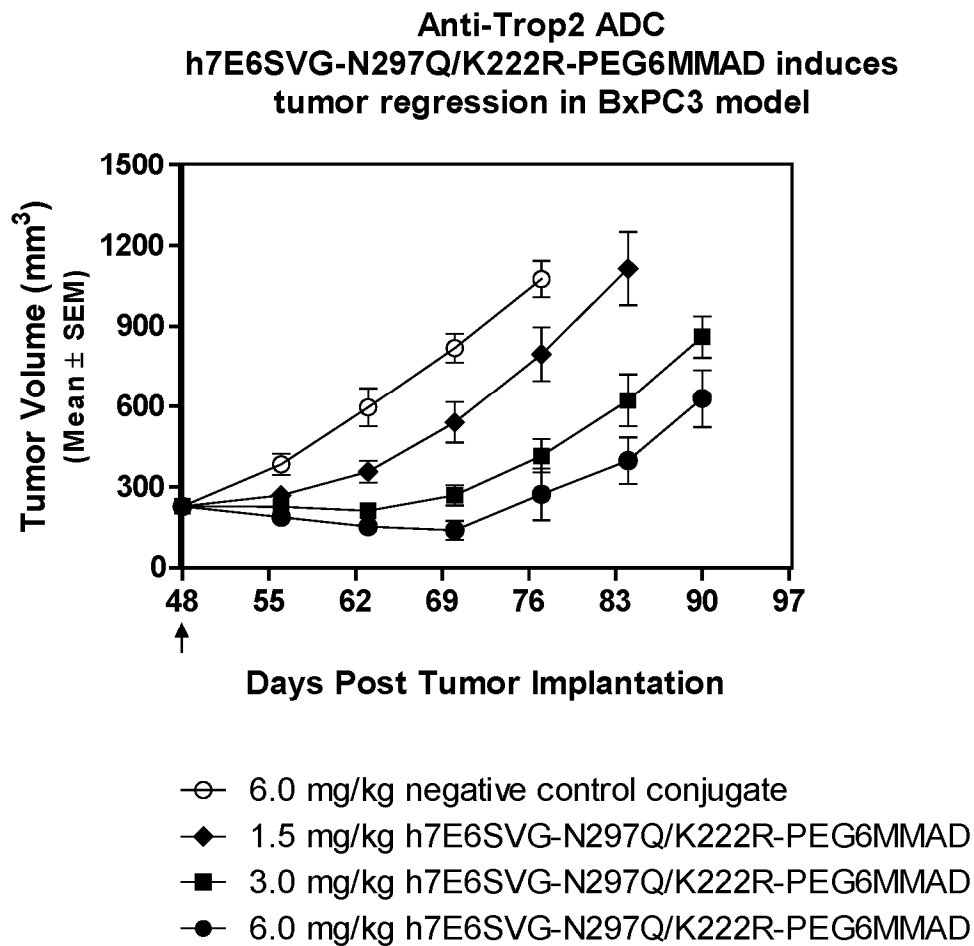


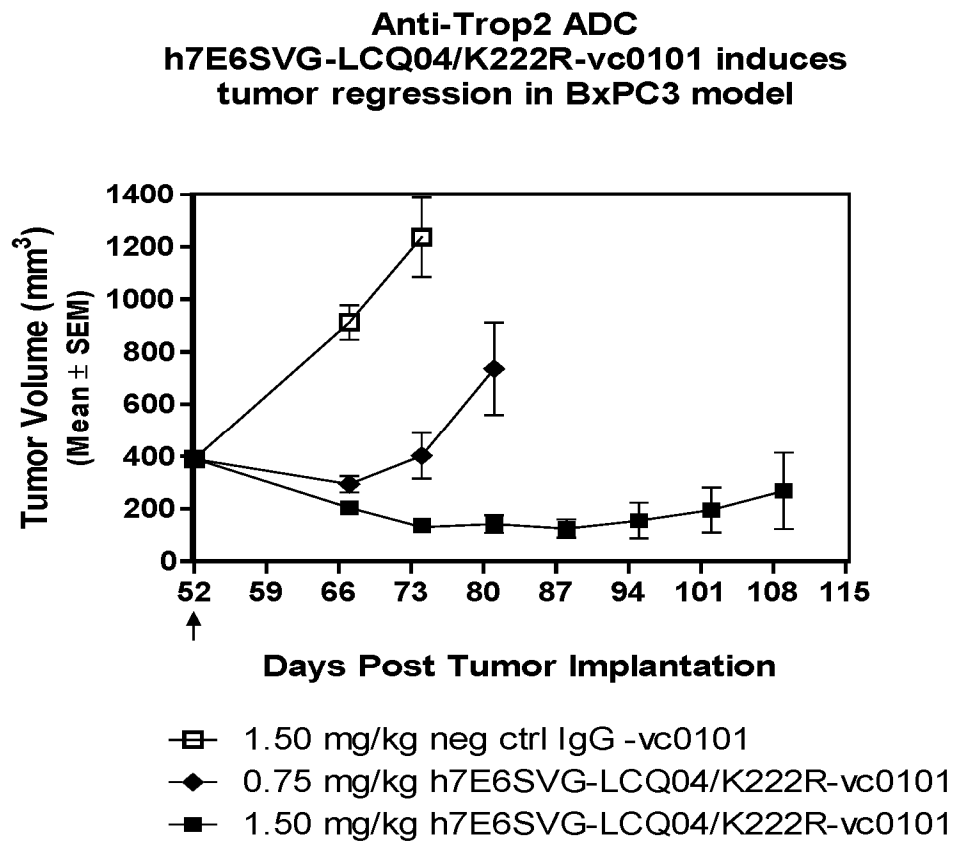
Figure 9C

Figure 10

**h7E6SVG-TG6-vc0101 and
h7E6SVG-LCQ03/K222R-vc0101 induce tumor
regression in colo205 xenograft model**

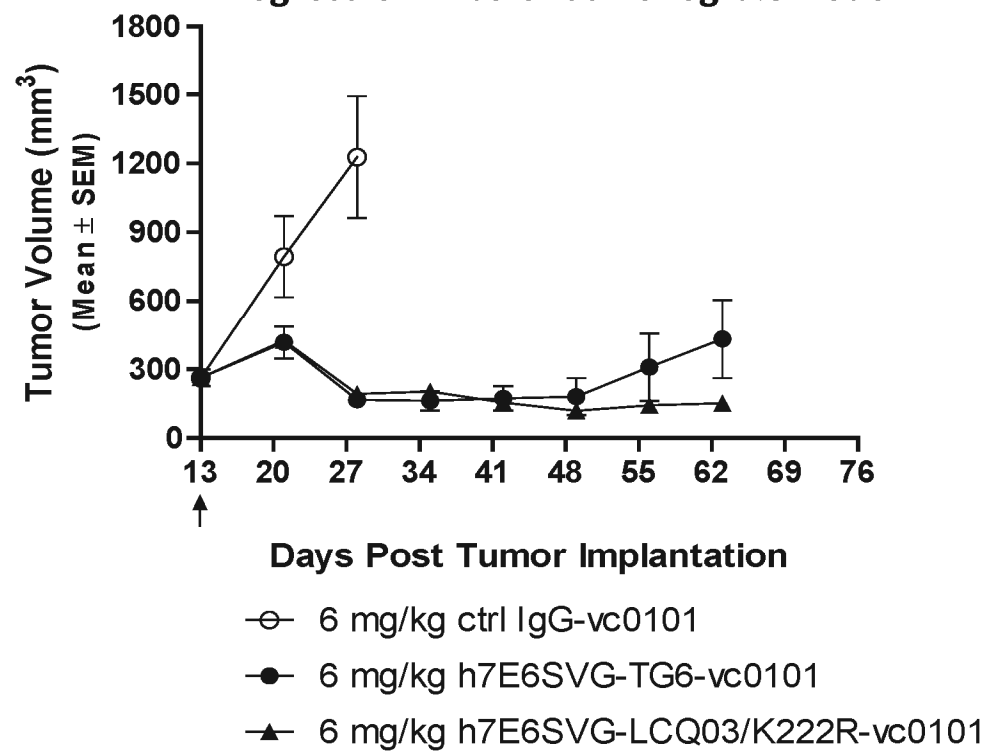


Figure 11

h7E6SVG-TG6-vc0101 induces tumor regression in Ova196756 PDX model

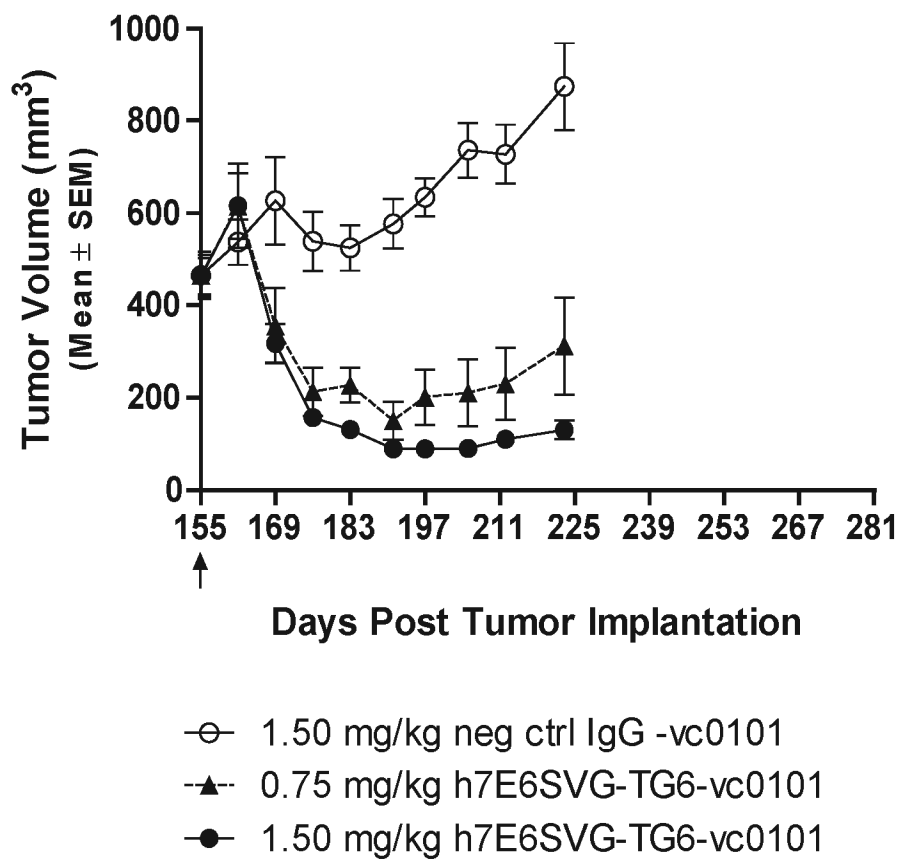
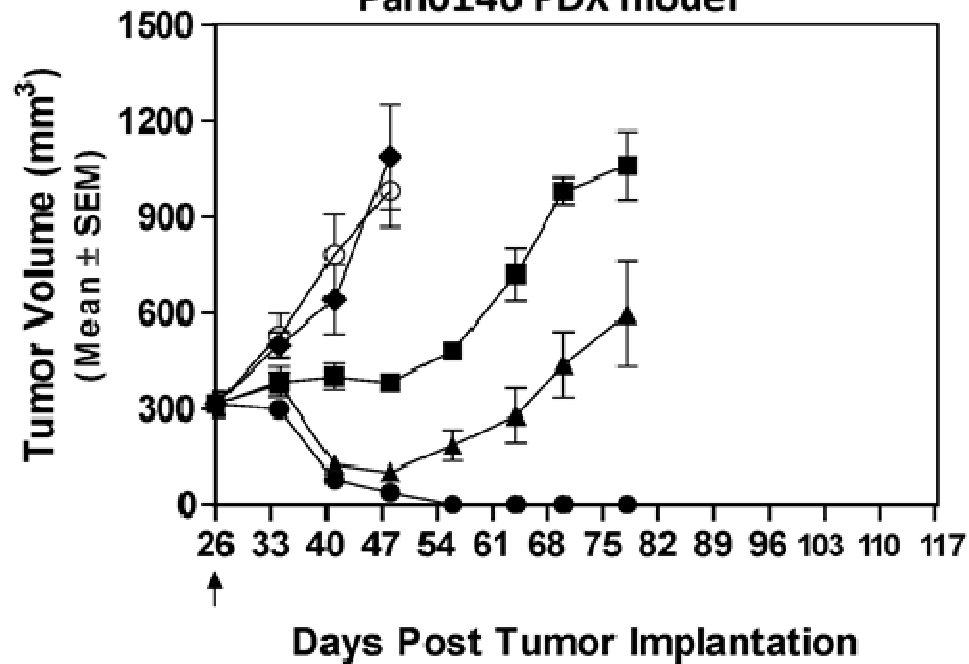


Figure 12A

**h7E6SVG-TG6-vc0101 induces tumor regression in
Pan0146 PDX model**



- 3.00 mg/kg ctrl IgG-vc0101
- ◆ 0.75 mg/kg h7E6SVG-TG6-vc0101
- ▲ 1.50 mg/kg h7E6SVG-TG6-vc0101
- 3.00 mg/kg h7E6SVG-TG6-vc0101
- 75 mg/kg Gemcitabine (2qw)
6 doses

Figure 12B

**h7E6SVG-TG6-vc0101 induces long term tumor regression in
Pan0146 PDX model through continued dosing**

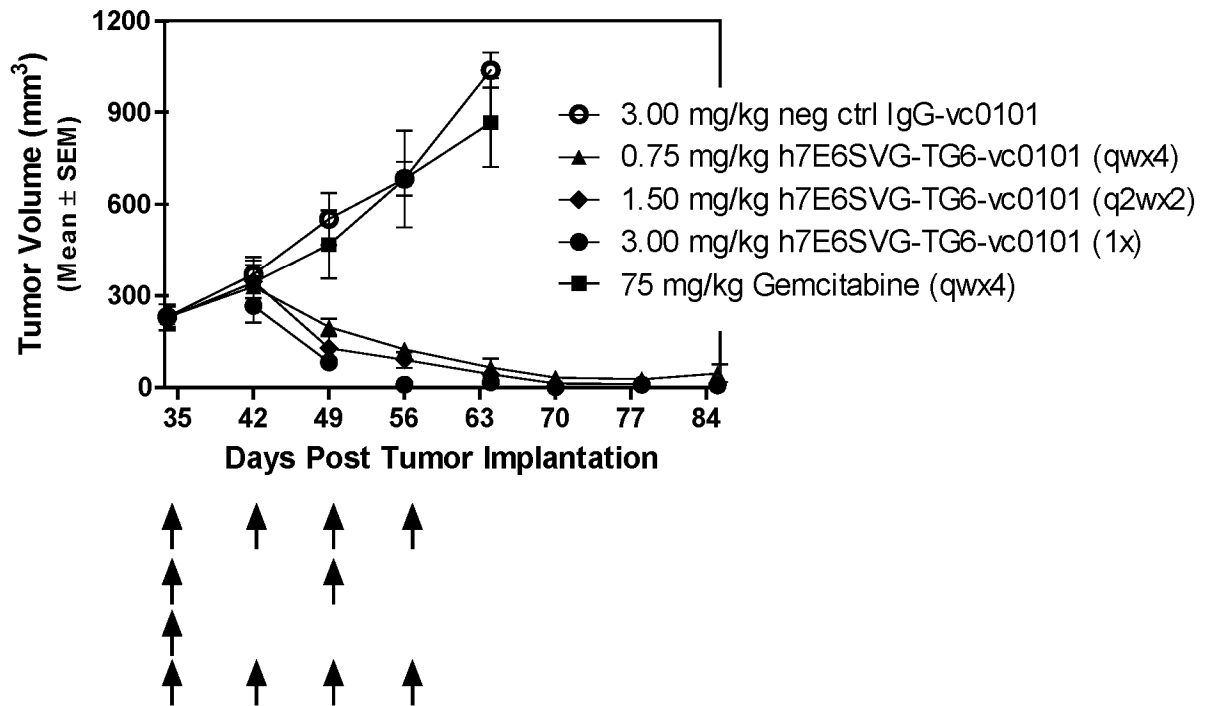


Figure 13

h7E6SVG N297Q/K222R PEG6MMAD induces tumor regression in Pan144607 PDX model

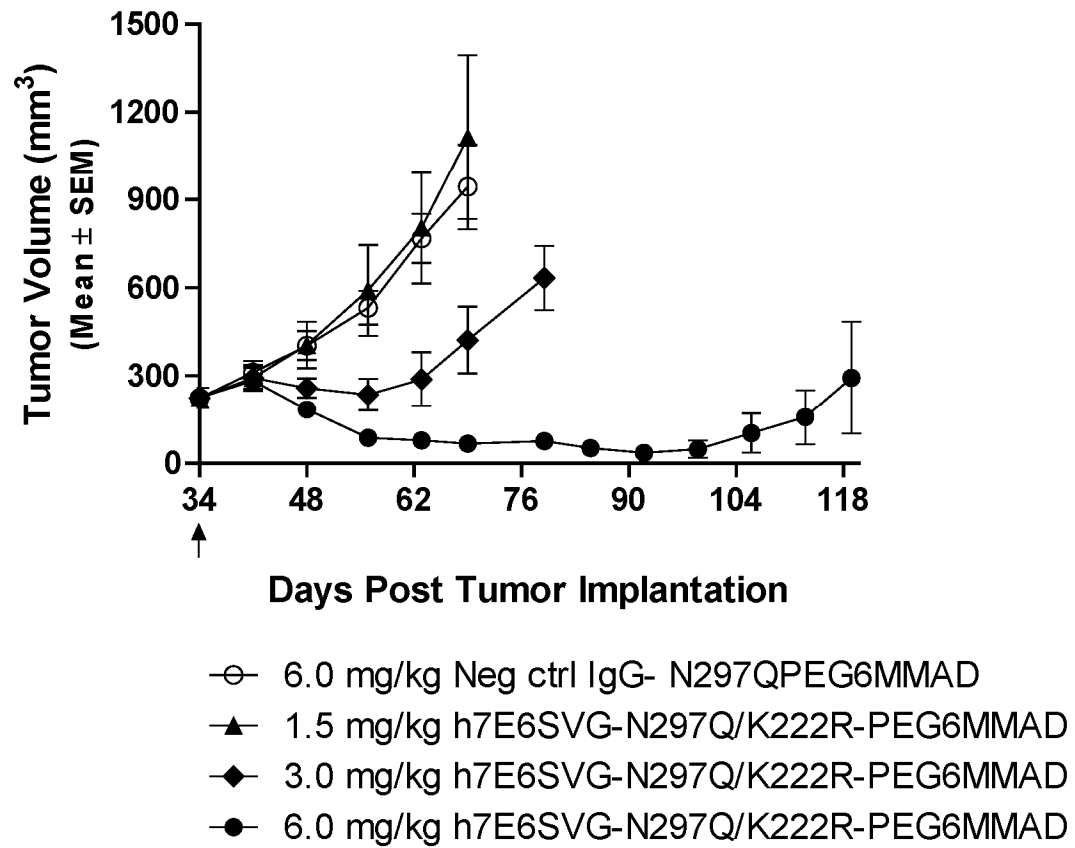
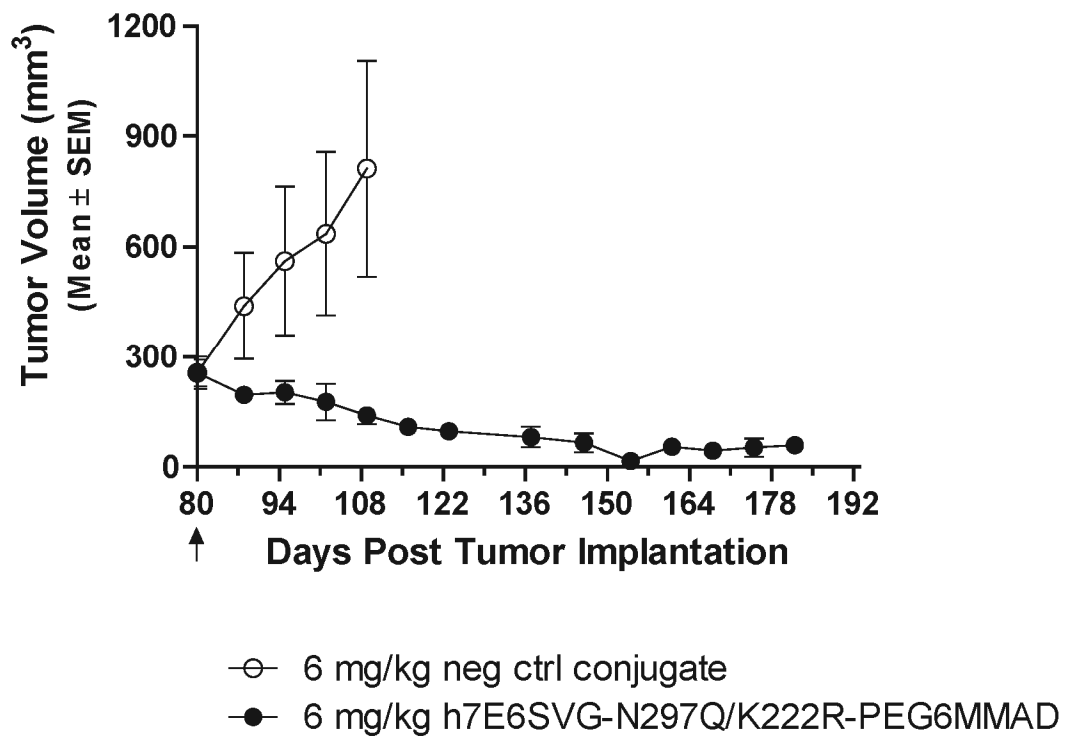


Figure 14

**h7E6SVG-N297Q/K222R induces tumor regression
in Pan0135 PDX model**



PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)
LISTADO DE SECUENCIA

<110> Rinat Neuroscienc Corp.
Liu, Shu-Hui
Ho, Wei-Hsien
Strop, Pavel
Dorywalska, Magdalena G
Rajpal, Arvind
Shelton, David
Tran, Thomas-Toan

<120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA TROP-2 Y SUS USOS

<130> PC71866A

<150> US 61/559,015
<151> 2011-11-11

<150> US 61/640,641
<151> 2012-04-30

<150> US 61/717,288
<151> 2012-10-23

<160> 130

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo Sintético

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

100

105

110

<210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> constructo sintético

<400> 2

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 3

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

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

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

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

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

Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 4
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 4

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 5

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Thr Ser Gly Val Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 6

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

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

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

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

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

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

Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 7
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

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

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

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

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

Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 8

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 9

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

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

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

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Thr Tyr Gly Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 10

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 Thr 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

Tyr 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 Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 11
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Constructo sintético

<400> 11

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

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 12

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 Thr 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

Tyr 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 Ser Gln Ser Phe Ser Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 13

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 13

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

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Phe Pro Ser Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 333

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 14

gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc	60
atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggtac	120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct	180
gggggtccctg ccagggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gcttccgtac	300
acgttcggag gggggaccaa gctggagatc aaa	333

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<210> 15
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Constructo sintético

 <400> 15
 caggtccaac tgcaggaatc aggtccaggc ctggtgaaac cgtctgaaac cctgagcctg 60
 acatgcaccg tgagcgggtg tagtattagc tcttacggcg tccattggat ccgtcaaccg 120
 cctggtaaag gtctggaatg gattggcgtg atctggaccg gtggtagcac cgactataac 180
 agcgactga tgagccgcgt gaccatctcg gtagacacgt cgaaaaacca gttcagcctg 240
 aaactgagca gcgtgaccgc cgcggatacc gctgtttatt actgcgcacg cgacggggat 300
 tatgatcgct acaccatgga ttattggggc cagggtagcc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 16
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Constructo sintético

 <400> 16
 gatatcgtaa tgaccaatc tccggattcg ctggcgggtat cactgggcga acgtgccacg 60
 attaactgcc gtgcaagcaa atcagtgtcg acctccggct acagctatat gactgggtat 120
 caacagaaac cgggccagcc gccgaaactg ctgatctatc tggctagcaa cctggagagc 180
 ggtgtgcctg atcgctttag tggctccggt agcggtagcg atttcacgct gaccatcagc 240
 tccctgcagg cagaagacgt ggccgtgtat tattgtcagc acagccgtga gctgccgtat 300
 acttttggcc aggggacaaa actggaaatc aaa 333

<210> 17
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Constructo sintético

 <400> 17
 caggtccaac tgcaggaatc aggtccaggc ctggtgaaac cgtctgaaac cctgagcctg 60
 acatgcaccg tgagcgggtg tagtattagc tcttacggcg tccattggat ccgtcaaccg 120
 cctggtaaag gtctggaatg gattggcgtg atctggaccg gtggtagcac cgactataac 180
 agcgactga tgagccgcgt gaccatctcg gtagacacgt cgaaaaacca gttcagcctg 240
 aaactgagca gcgtgaccgc cgcggatacc gctgtttatt actgcgcacg cgacggggat 300

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

tatgatcgct acaccatgga ttattggggc cagggtagcc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 18
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 18
 caggtccaac tgcaggaatc aggtccaggc ctggtgaaac cgtctgaaac cctgagcctg 60
 acatgcaccg tgagcgggtg tagtattagc tcttacggcg tccattggat ccgtcaaccg 120
 cctggtaaag gtctggaatg gattggcgtg atctggacca gtggtgtgac cgactataac 180
 agcgcaactga tgggccgcgt gaccatctcg gtagacacgt cgaaaaacca gttcagcctg 240
 aaactgagca gcgtgaccgc cgcggatacc gctgtttatt actgcgcacg cgacggggat 300
 tatgatcgct acaccatgga ttattggggc cagggtagcc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 19
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 19
 gatatcgtaa tgaccaatc tccggattcg ctggcgggtat cactgggcga acgtgccacg 60
 attaactgcc gtgcaagcaa atcagtgtcg acctccttgt acagctatat gactgggtat 120
 caacagaaac cgggccagcc gccgaaactg ctgatctatc tggctagcaa cctggagagc 180
 ggtgtgcctg atcgctttag tggctccggt agcggtagcg atttcacgct gaccatcagc 240
 tccctgcagg cagaagacgt ggccgtgtat tattgtcagc acagccgtga gctgccgtat 300
 acttttggcc aggggacaaa actggaaatc aaa 333

<210> 20
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 20
 gatatcgtaa tgaccaatc tccggattcg ctggcgggtat cactgggcga acgtgccacg 60
 attaactgcc gtgcaagcaa atcagtgtcg acctccaatt acagctatat gactgggtat 120
 caacagaaac cgggccagcc gccgaaactg ctgatctatc tggctagcaa cctggagagc 180
 ggtgtgcctg atcgctttag tggctccggt agcggtagcg atttcacgct gaccatcagc 240

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

tccctgcagg cagaagacgt ggccgtgtat tattgtcagc acagccgtga gctgccgtat 300
acttttggcc aggggacaaa actggaaatc aaa 333

<210> 21
<211> 321
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 21
gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60
ttctcctgca gggccagtca gaccattggc acaagcatat actggatatca gcaaagaaca 120
aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 180
aggtttagtg gcagtggtac agggacagat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct 240
gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggccattcac gttcggctcg 300
gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 22
<211> 345
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 22
caggccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga taaactgggt gaagcagagg 120
cctggacatg gccttgagtg gatcggaaat atttatcctt ctgatagtta ttctaactac 180
aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaggta gcagcccgc atctgaggac tctgcggtct attactgtac gtacggtagt 300
agctttgact actggggcca aggcaccacg gtcaccgtct cctca 345

<210> 23
<211> 321
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 23
gagatcgtgc tgacccaaag tccagccacc ctttccctgt ctccaggcga acgcgcaacc 60
ctgagctgcc gcgcttctca gaccattggt acctccattc attggatatca gcagaagccc 120

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

ggccaagccc cgcgctctgct gatctattac gcctcagaaa gtatttcagg catccccgct	180
cgcttctccg gctccggcag cggaaccgac ttcacactta caatctctag tttggagcca	240
gaagacttcg ccgtttacta ctgtcagcag tctaacagct ggccatttac ctttggccag	300
ggcacgaagc tggaaatcaa g	321

<210> 24
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 24 caggtgcagt tggttcagag cggcgcggaa gtcaagaaac ccggcgcctc cgtgaaagtg	60
agctgcaaag cgagcggcta caccttcacc agttattgga ttaactgggt gcgccaggcc	120
ccaggccagg ggctggagt gatgggaaac atctacccat ctgactctta cagcaactat	180
aatcagaaat ttaaggatcg cgtaacaatg acccgtgaca ccagcaccag cactgtttac	240
atggagctga gttctctgcg ttctgaagat accgccgtgt actactgcgc acgcggttcc	300
agtttcgatt actggggcca ggggaccctg gtcaccgtct cctca	345

<210> 25
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 25 caggtgcagt tggttcagag cggcgcggaa gtcaagaaac ccggcgcctc cgtgaaagtg	60
agctgcaaag cgagcggcta caccttcacc agttattgga ttaactgggt gcgccaggcc	120
ccaggccagg ggctggagt gatgggaaac atcttcccat ctgactctta cagcaactat	180
aataagaaat ttaaggatcg cgtaacaatg acccgtgaca ccagcaccag cactgtttac	240
atggagctga gttctctgcg ttctgaagat accgccgtgt actactgcgc acgcggttcc	300
gggttcgatt actggggcca ggggaccctg gtcaccgtct cctca	345

<210> 26
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 26 gagatcgtgc tgacccaaag tccagccacc ctttccctgt ctccaggcga acgcgcaacc	60
---	----

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

```

ctgagctgcc gcgcttctca gaccattggt acctccattc attggtatca gcagaagccc      120
ggccaagccc cgcgtctgct gatctattac gcctcagaaa gtatttcagg catccccgct      180
cgcttctccg gctccggcag cggaaccgac ttcacactta caatctctag tttggagcca      240
gaagacttcg ccgtttacta ctgttcgcag tcttttagct ggccatttac ctttggccag      300
ggcacgaagc tggaaatcaa g                                              321

```

```

<210> 27
<211> 323
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 27

```

```

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

```

```

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

```

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

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> 28
<211> 317
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 28

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

Met Ala Thr Arg Phe Cys Thr Ala Gln Ser Asn Cys Thr Cys Pro Thr
20 25 30

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

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

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Ser Lys Cys Leu Leu Leu Lys Ala Arg Met Ser Ala Arg Lys Ser Gly
65 70 75 80

Arg Ser Leu Val Met Pro Ser Glu His Ala Ile Leu Asp Asn Asp Gly
85 90 95

Leu Tyr Asp Pro Glu Cys Asp Asp Lys Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
100 105 110

Cys Asn Gln Thr Ser Val Cys Trp Cys Val Asn Ser Val Gly Val Arg
115 120 125

Arg Thr Asp Lys Gly Asp Gln Ser Leu Arg Cys Asp Glu Val Val Arg
130 135 140

Thr His His Ile Leu Ile Glu Leu Arg His Arg Pro Thr Asp Arg Ala
145 150 155 160

Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ser Glu Leu Arg Arg Leu Phe Gln Glu
165 170 175

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

Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn Ala Ser Gln Lys Gly Leu
195 200 205

Arg Asp Val Asp Ile Ala Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Glu Arg Asp Ile
210 215 220

Lys Gly Glu Ser Leu Phe Met Gly Arg Arg Gly Leu Asp Val Gln Val
225 230 235 240

Arg Gly Glu Pro Leu His Val Glu Arg Thr Leu Ile Tyr Tyr Leu Asp
245 250 255

Glu Lys Pro Pro Gln Phe Ser Met Lys Arg Leu Thr Ala Gly Val Ile
260 265 270

Ala Val Ile Ala Val Val Ser Val Ala Val Val Ala Gly Val Val Val
275 280 285

Leu Val Val Thr Lys Arg Arg Lys Ser Gly Lys Tyr Lys Lys Val Glu
290 295 300

Leu Lys Glu Leu Gly Glu Met Arg Ser Glu Pro Ser Leu
305 310 315

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<210> 29
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Met Ala Pro Pro Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Thr Ala Thr Phe Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr
 20 25 30

Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys
 35 40 45

Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn Thr Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala
 50 55 60

Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg
 65 70 75 80

Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp
 85 90 95

Pro Asp Cys Asp Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly
 100 105 110

Thr Ser Thr Cys Trp Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp
 115 120 125

Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile
 130 135 140

Ile Ile Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys
 145 150 155 160

Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu
 165 170 175

Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr
 180 185 190

Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp
 195 200 205

Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser
 210 215 220

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu
225 230 235 240

Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala
245 250 255

Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile Ala Val Ile
260 265 270

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

Ser Arg Lys Lys Arg Met Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Glu Ile Lys Glu
290 295 300

Met Gly Glu Met His Arg Glu Leu Asn Ala
305 310

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 30

Ser Tyr Gly Val His
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 31

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
1 5

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 32

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His
1 5 10

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 33

Val Ile Trp Thr Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
1 5 10 15

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 34

Trp Thr Gly Gly Ser
1 5

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 35

Asp Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 36

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 37
<211> 10
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 37

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Gly Val His
1 5 10

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 38

Val Ile Trp Thr Ser Gly Val Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met Gly
1 5 10 15

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 39

Trp Thr Ser Gly Val
1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 40

Ser Tyr Trp Ile Asn
1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 41

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
1 5

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 42

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn
1 5 10

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 43

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

Asp

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 44

Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr
1 5

<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 45

Gly Ser Ser Phe Asp Tyr
1 5

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<210> 46
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 46

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

Asp

<210> 47
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 47

Phe Pro Ser Asp Ser Tyr
 1 5

<210> 48
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 48

Gly Ser Gly Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 49
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser G o S

<220>
 <221> MISC_FEATURE

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser S o V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa puede ser G o S

<400> 49

Val	Ile	Trp	Thr	Xaa	Gly	Xaa	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met	Xaa
1				5				10						15	

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser G o S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser S o V

<400> 50

Trp	Thr	Xaa	Gly	Xaa
1				5

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser Y o F

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa puede ser Q o K

<400> 51

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

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

Asp

<210> 52
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser Y o F

<400> 52

Xaa Pro Ser Asp Ser Tyr
 1 5

<210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser G o S

<400> 53

Gly Ser Xaa Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 54

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 55

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 56

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 57

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Leu Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 58

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Asn Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15

<210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<400> 59

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

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 60

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 61

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 62

Ser Gln Ser Phe Ser Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa puede ser G, L, o N

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<400> 63

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Xaa Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be Q or S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser N o F

<400> 64

Xaa Gln Ser Xaa Ser Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 65

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 65

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Thr Ser Gly Val Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Arg Asp Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

340

345

350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 66

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 66

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

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

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

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

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

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 67
<211> 445
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 67

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

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Phe Pro Ser Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 68
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 68

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 Thr 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

Tyr 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 Ser Gln Ser Phe Ser Trp Pro Phe
85 90 95

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 69
<211> 316
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser Q o L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser V o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser A o P

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa puede ser F o L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa puede ser G o L

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser A o L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa puede ser T o V

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa puede ser A o T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser T o G

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa puede ser F o H

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa puede ser A o T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa puede ser E o N

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa puede ser V o T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa puede ser E o P

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa puede ser N o T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa puede ser Y o N

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa puede ser A o T

<220>
 <221> MISC_FEATURE

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<222> (35)..(35)
<223> Xaa puede ser N o C

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36)..(36)
<223> Xaa puede ser C o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(37)
<223> Xaa puede ser F o P

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (38)..(38)
<223> Xaa puede ser V o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (39)..(39)
<223> Xaa puede ser N o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (40)..(40)
<223> Xaa puede ser N o P

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (41)..(41)
<223> Xaa puede ser N o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (42)..(42)
<223> Xaa puede ser R o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> Xaa puede ser Q o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> Xaa puede ser T o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (52)..(52)
<223> Xaa puede ser Q o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (53)..(53)
<223> Xaa puede ser N o M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (54)..(54)
<223> Xaa puede ser T o A

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (56)..(56)
 <223> Xaa puede ser I o D

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (59)..(59)
 <223> Xaa puede ser K o T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (61)..(61)
 <223> Xaa puede ser A o T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (70)..(70)
 <223> Xaa puede ser E o R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (72)..(72)
 <223> Xaa puede ser N o S

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (74)..(74)
 <223> Xaa puede ser S o P

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 <223> Xaa puede ser L o N

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (79)..(79)
 <223> Xaa puede ser R o T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (80)..(80)
 <223> Xaa puede ser A o L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (81)..(81)
 <223> Xaa puede ser K o V

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (82)..(82)
 <223> Xaa puede ser R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (84)..(84)
 <223> Xaa puede ser S

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (86)..(86)

<223> Xaa puede ser G o H

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(89)

<223> Xaa puede ser Q o V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (90)..(90)

<223> Xaa puede ser N o D

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (101)..(101)

<223> Xaa puede ser E o P

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (102)..(102)

<223> Xaa puede ser S o E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (104)..(104)

<223> Xaa puede ser L o R

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (112)..(112)

<223> Xaa puede ser G o Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (115)..(115)

<223> Xaa puede ser T o V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (122)..(122)

<223> Xaa puede ser A o V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (130)..(130)

<223> Xaa puede ser G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (132)..(132)

<223> Xaa puede ser T o L

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (133)..(133)

<223> Xaa puede ser E o S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (135)..(135)

<223> Xaa puede ser T o R

<220>

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<221> MISC_FEATURE
<222> (137)..(137)
<223> Xaa puede ser S o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (139)..(139)
<223> Xaa puede ser R o L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (144)..(144)
<223> Xaa puede ser W o H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (153)..(153)
<223> Xaa puede ser A o P

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (154)..(154)
<223> Xaa puede ser R o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (155)..(155)
<223> Xaa puede ser E o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (156)..(156)
<223> Xaa puede ser K o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (157)..(157)
<223> Xaa puede ser P o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (159)..(159)
<223> Xaa puede ser D o N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (160)..(160)
<223> Xaa puede ser S o H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (161)..(161)
<223> Xaa puede ser K o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (162)..(162)
<223> Xaa puede ser S o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (164)..(164)
<223> Xaa puede ser R o D

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (165)..(165)
 <223> Xaa puede ser T o A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (166)..(166)
 <223> Xaa puede ser A o E

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (168)..(168)
 <223> Xaa puede ser Q o R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (170)..(170)
 <223> Xaa puede ser E o L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (171)..(171)
 <223> Xaa puede ser I o F

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (172)..(172)
 <223> Xaa puede ser T o R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (173)..(173)
 <223> Xaa puede ser T o E

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (176)..(176)
 <223> Xaa puede ser Q o R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (178)..(178)
 <223> Xaa puede ser D o H

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (183)..(183)
 <223> Xaa puede ser T o A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (186)..(186)
 <223> Xaa puede ser L o H

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (190)..(190)
 <223> Xaa puede ser N o P

<220>
 <221> MISC_FEATURE

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<222> (191)..(191)
<223> Xaa puede ser V o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (193)..(193)
<223> Xaa puede ser T o Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (197)..(197)
<223> Xaa puede ser V o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (204)..(204)
<223> Xaa puede ser T o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (205)..(205)
<223> Xaa puede ser Q o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (206)..(206)
<223> Xaa puede ser N o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (213)..(213)
<223> Xaa puede ser V o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (228)..(228)
<223> Xaa puede ser H o Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (229)..(229)
<223> Xaa puede ser S o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (231)..(231)
<223> Xaa puede ser K o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (232)..(232)
<223> Xaa puede ser G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (236)..(236)
<223> Xaa puede ser T o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (238)..(238)
<223> Xaa puede ser N o R

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (241)..(241)
<223> Xaa puede ser Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (242)..(242)
<223> Xaa puede ser L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (243)..(243)
<223> Xaa puede ser D o P

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (245)..(245)
<223> Xaa puede ser D o Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (246)..(246)
<223> Xaa puede ser P o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (247)..(247)
<223> Xaa puede ser G o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (248)..(248)
<223> Xaa puede ser Q o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (257)..(257)
<223> Xaa puede ser K o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (258)..(258)
<223> Xaa puede ser A o P

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (260)..(260)
<223> Xaa puede ser E o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (264)..(264)
<223> Xaa puede ser Q o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (265)..(265)
<223> Xaa puede ser G o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (267)..(267)

```

<223> Xaa puede ser K o T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (286)..(267)

<223> Xaa puede ser K o T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (286)..(286)

<223> Xaa puede ser V o A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (292)..(292)

<223> Xaa puede ser R o N

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (296)..(296)

<223> Xaa puede ser M o S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (300)..(300)

<223> Xaa puede ser E o K

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (302)..(302)

<223> Xaa puede ser A o V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (311)..(311)

<223> Xaa puede ser H o R

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (314)..(314)

<223> Xaa puede ser L o P

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (315)..(315)

<223> Xaa puede ser N o S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (316)..(316)

<223> Xaa puede ser A o L

<400> 69

Pro Pro Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu Leu Leu Xaa Ala Ala Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Ala Ala Gln Asp Xaa Cys Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Lys Leu
20 25 30

Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Gln Cys Xaa Ala

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

35

40

45

Leu Gly Ala Xaa Xaa Xaa Val Xaa Cys Ser Xaa Leu Xaa Ala Lys Cys
 50 55 60

Leu Leu Leu Lys Ala Xaa Met Xaa Ala Xaa Lys Xaa Ala Arg Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Xaa Pro Xaa Glu Xaa Ala Leu Xaa Xaa Asn Asp Gly Leu Tyr Asp
 85 90 95

Pro Asp Cys Asp Xaa Xaa Gly Xaa Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Xaa
 100 105 110

Thr Ser Xaa Cys Trp Cys Val Asn Ser Xaa Gly Val Arg Arg Thr Asp
 115 120 125

Lys Xaa Asp Xaa Xaa Ile Xaa Cys Xaa Glu Xaa Val Arg Thr His Xaa
 130 135 140

Ile Ile Ile Asp Leu Lys His Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa
 145 150 155 160

Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Tyr Xaa
 165 170 175

Leu Xaa Pro Lys Phe Ile Xaa Ala Ile Xaa Tyr Glu Asn Xaa Xaa Ile
 180 185 190

Xaa Ile Asp Leu Xaa Gln Asn Ser Ser Gln Lys Xaa Xaa Xaa Asp Val
 195 200 205

Asp Ile Ala Asp Xaa Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Ile Lys Gly Glu
 210 215 220

Ser Leu Phe Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Leu Asp Leu Xaa Val Xaa Gly Glu
 225 230 235 240

Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Leu Ile Tyr Tyr Leu Asp Glu
 245 250 255

Xaa Xaa Pro Xaa Phe Ser Met Xaa Xaa Leu Xaa Ala Gly Leu Ile Ala
 260 265 270

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

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)
 Val Ile Ser Xaa Lys Lys Lys Xaa Ala Lys Tyr Xaa Lys Xaa Glu Ile
 290 295 300

Lys Glu Leu Gly Glu Leu Xaa Lys Glu Xaa Xaa Xaa
 305 310 315

<210> 70
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser P o L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser G o D

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser P

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser P

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa puede ser R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa puede ser L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa puede ser P

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa puede ser A o M

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa puede ser V o A

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa puede ser G o R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa puede ser H o F

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa puede ser T o C

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa puede ser A o T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa puede ser D o S

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa puede ser S o D

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (46)..(46)
 <223> Xaa puede ser P o T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (47)..(47)
 <223> Xaa puede ser D o N

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (52)..(52)
 <223> Xaa puede ser R o V

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (61)..(61)
 <223> Xaa puede ser G o Q

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (63)..(63)
 <223> Xaa puede ser A o L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (83)..(83)
 <223> Xaa puede ser P o R

<220>
 <221> MISC_FEATURE

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<222> (85)..(85)
<223> Xaa puede ser N o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (91)..(91)
<223> Xaa puede ser R o M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (110)..(110)
<223> Xaa puede ser P o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (111)..(111)
<223> Xaa puede ser E o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (141)..(141)
<223> Xaa puede ser L o Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (164)..(164)
<223> Xaa puede ser A o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (165)..(165)
<223> Xaa puede ser G o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (181)..(181)
<223> Xaa puede ser R o Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (189)..(189)
<223> Xaa puede sere K o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (198)..(198)
<223> Xaa puede ser Q o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (209)..(209)
<223> Xaa puede ser T o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (214)..(214)
<223> Xaa puede ser A o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (214)..(214)
<223> Xaa puede ser A o L

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (215)..(215)
 <223> Xaa puede ser G o R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (237)..(237)
 <223> Xaa puede ser Q o M

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (240)..(240)
 <223> Xaa puede ser G o R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (245)..(245)
 <223> Xaa puede ser R o Q

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (252)..(252)
 <223> Xaa puede ser Q o H

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (264)..(264)
 <223> Xaa puede ser I o K

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (267)..(267)
 <223> Xaa puede ser K o Q

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (282)..(282)
 <223> Xaa puede ser V o A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (285)..(285)
 <223> Xaa puede ser V o S

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (293)..(293)
 <223> Xaa puede ser A o V

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (299)..(299)
 <223> Xaa puede ser N o K

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (319)..(319)
 <223> Xaa puede ser K o S

<400> 70

Met Ala Arg Gly Xaa Xaa Leu Ala Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Leu Ala Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Gln Xaa
 20 25 30
 Asn Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Xaa Xaa Xaa Gly
 35 40 45
 Pro Gly Gly Xaa Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Xaa Met Xaa 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 Xaa Lys Xaa Ala Arg Ser Leu Val Xaa Pro Ser Glu His Ala
 85 90 95
 Ile Leu Asp Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Xaa Xaa 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 Xaa 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 Xaa Xaa Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu
 165 170 175
 Arg Arg Leu Phe Xaa Glu Arg Tyr Lys Leu His Pro Xaa Phe Leu Ala
 180 185 190
 Ala Val His Tyr Glu Xaa Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
 195 200 205
 Xaa Ser Gln Lys Ala Xaa Xaa Asp Val Asp Ile Ala Asp Ala Ala Tyr
 210 215 220
 Tyr Phe Glu Arg Asp Ile Lys Gly Glu Ser Leu Phe Xaa Gly Arg Xaa
 225 230 235 240
 Gly Leu Asp Leu Xaa Val Arg Gly Glu Pro Leu Xaa Val Glu Arg Thr
 245 250 255

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

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

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

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

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

Pro Ser Leu

<210> 71
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 71

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 72

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 72

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

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

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

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

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

Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 73

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 73

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

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 74
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 74

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 Thr 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

Tyr 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 Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 75
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 75

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Leu Leu Gln Gly Gly
1 5

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser F o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser L o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser T o S

<400> 76

Gly Xaa Ser Xaa Xaa Ser Tyr
1 5

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser L o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser L o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser T o S

<400> 77

Gly Xaa Ser Xaa Xaa Ser Tyr Gly Val His
1 5 10

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<210> 78
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 78

Gly Gly Leu Leu Gln Gly Gly
 1 5

<210> 79
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 79

Leu Leu Gln Gly Ala
 1 5

<210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 80

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 81
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 81

Gly Gly Leu Leu Gln Gly Ala
 1 5

<210> 82
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> Xaa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser M o E

<220>

<221> Xaa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser E o M

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser M o E

<400> 82

Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Xaa Asp Tyr
1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<400> 83

Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Xaa Asp Tyr
1 5

<210> 84

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (98)..(98)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(99)

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (106)..(106)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<400> 84

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Thr Ser Gly Val Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Xaa Xaa Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Xaa Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 85

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (98)..(98)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(99)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<220>

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<221> MISC_FEATURE
<222> (106)..(106)
<223> Xaa puede ser M o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (106)..(106)
<223> Xaa puede ser E o M

<400> 85

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Thr Ser Gly Val Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Xaa Xaa Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Xaa Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<400> 86

Xaa Xaa Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Xaa Asp Tyr
 1 5 10

<210> 87
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser E o M

<400> 87

Xaa Xaa Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Xaa Asp Tyr
 1 5 10

<210> 88
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser G o P

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser A, G, P, o ausente

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser A, G, K, P, o ausente

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser G, K, o ausente

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser K o ausente

<400> 88

Leu Leu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 89
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural o ausente

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural o ausente

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural o ausente

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural o ausente

<400> 89

Leu Leu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 90
 <211> 7

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 90

Leu Leu Gln Gly Pro Gly Lys
1 5

<210> 91
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 91

Leu Leu Gln Gly Pro Gly
1 5

<210> 92
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 92

Leu Leu Gln Gly Pro Ala
1 5

<210> 93
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 93

Leu Leu Gln Gly Pro
1 5

<210> 94
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 94

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Leu Leu Gln Pro
1

<210> 95
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 95

Leu Leu Gln Pro Gly Lys
1 5

<210> 96
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 96

Leu Leu Gln Gly Ala Pro Gly Lys
1 5

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 97

Leu Leu Gln Gly Ala Pro Gly
1 5

<210> 98
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 98

Leu Leu Gln Gly Ala Pro
1 5

<210> 99
<211> 9

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 99

Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 100

Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Glu Asp Tyr
1 5

<210> 101
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (98)..(98)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(99)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (106)..(106)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<400> 101

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

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

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 102
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (98)..(98)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(99)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presencia natural

<220>
 <221> MISC_FEATURE

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<222> (106)..(106)

<223> Xaa puede ser E o M

<400> 102

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Thr Ser Gly Val Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Xaa Xaa Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Xaa Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 103

Leu Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 104

Tyr Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 105

Phe Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 106

His Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 107

Ala Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<210> 108
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 108

Thr Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 109
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 109

Ser Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 110
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 110

Ile Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 111
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 111

Arg Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 112
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 112

Val Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 113

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 113

Trp Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 114

Gln Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 115

Gly Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 116

Lys Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<210> 117
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 117

Asp Ser Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 118
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 118

Asp Lys Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 119
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 119

Asp His Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 120
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 120

Asp Ala Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 121
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 121

Asp Phe Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 122

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 122

Asp Thr Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 123

Asp Arg Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 124

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 124

Asp Val Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 125

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 125

Asp Gln Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<210> 126
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 126

Asp Leu Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 127
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 127

Asp Tyr Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 128
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 128

Asp Glu Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 129
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 129

Asp Asn Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 130
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

PC71866A SEQUENCE LISTING_ST25 (1)

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 130

Asp	Trp	Asp	Tyr	Asp	Arg	Tyr	Thr	Met	Asp	Tyr
1				5					10	

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC71866A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2012/056234	International filing date (<i>day/month/year</i>) 07/11/2012	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 11/11/2011
Applicant RINAT NEUROSCIENCE CORP.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 9A
- ☒ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2012/056234

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)

☐

 on paper
 - ☒

 in electronic form
 - b. (time)

☒

 in the international application as filed
 - ☐

 together with the international application in electronic form
 - ☐

 subsequently to this Authority for the purpose of search
2.

☐

 In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2012/056234

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-9, 16, 17(completely); 18-41(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/056234A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/30 A61K47/48
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/144891 A1 (ARIUS RES INC [CA]) 4 December 2008 (2008-12-04) the whole document ----- -/--	9,16,17, 22,23, 31-41



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 February 2013

Date of mailing of the international search report

04/06/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kalsner, Inge

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/056234

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOYCE VARUGHESE ET AL: "Cervical carcinomas overexpress human trophoblast cell-surface marker (Trop-2) and are highly sensitive to immunotherapy with hRS7, a humanized monoclonal anti-Trop-2 antibody", AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS & GYNECOLOGY, MOSBY, ST LOUIS, MO, US, vol. 205, no. 6, 29 June 2011 (2011-06-29), pages 567.e1-567.e7, XP028116550, ISSN: 0002-9378, DOI: 10.1016/J.AJOG.2011.06.093 [retrieved on 2011-07-13] the whole document -----	1-9, 16-41
Y	T. M. CARDILLO ET AL: "Humanized Anti-Trop-2 IgG-SN-38 Conjugate for Effective Treatment of Diverse Epithelial Cancers: Preclinical Studies in Human Cancer Xenograft Models and Monkeys", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 17, no. 10, 3 March 2011 (2011-03-03), pages 3157-3169, XP055044596, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2939 the whole document -----	1-9, 16-41
A	RHODA RAJI ET AL: "Uterine and ovarian carcinosarcomas overexpressing Trop-2 are sensitive to hRS7, a humanized anti-Trop-2 antibody", JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 30, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), page 106, XP055052404, ISSN: 1756-9966, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6135 abstract -----	36-41
X	WO 2007/095748 A1 (ARIUS RES INC [CA]) 30 August 2007 (2007-08-30) abstract -----	9,16,17, 22,23, 31-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/056234

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008144891	A1	04-12-2008	
		AU 2008255528 A1	04-12-2008
		CA 2687586 A1	04-12-2008
		CN 101679526 A	24-03-2010
		CO 6140062 A2	19-03-2010
		CR 11127 A	29-12-2009
		EC SP099770 A	28-12-2009
		EP 2155791 A1	24-02-2010
		JP 2010528056 A	19-08-2010
		KR 20100003366 A	08-01-2010
		MA 31393 B1	03-05-2010
		US 2008131428 A1	05-06-2008
		WO 2008144891 A1	04-12-2008
		ZA 200908346 A	25-08-2010

WO 2007095748	A1	30-08-2007	
		AU 2007218961 A1	30-08-2007
		AU 2007218962 A1	30-08-2007
		CA 2643561 A1	30-08-2007
		CA 2643603 A1	30-08-2007
		CN 101426904 A	06-05-2009
		CN 101432422 A	13-05-2009
		EP 1996700 A1	03-12-2008
		EP 1996701 A1	03-12-2008
		JP 2009527230 A	30-07-2009
		JP 2009528995 A	13-08-2009
		US 2007202043 A1	30-08-2007
		US 2007202113 A1	30-08-2007
		US 2009142263 A1	04-06-2009
		US 2009191118 A1	30-07-2009
		WO 2007095748 A1	30-08-2007
		WO 2007095749 A1	30-08-2007

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-9, 16, 17(completely); 18-41(partially)

An isolated anti-Trop-2 antibody designated 7E6 and variants thereof; conjugates comprising the antibody, an acyl donor glutamine-containing tag and a cytotoxic agent; pharmaceutical compositions, and methods of treating conditions associated with Trop-2 expression.

2. claims: 10-15(completely); 18-41(partially)

as above, but with respect to antibody 6G11

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO
(Solitud Divisional)

1. Un conjugado de un anticuerpo aislado, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, que se enlaza de manera específica a la superficie celular del trofoblasto-2 (Trop-2), en donde el anticuerpo comprende

(a) una región variable de cadena pesada (VH) complementaria que determina regiones que comprenden (i) una región de determinación complementaria VH (CDR1) que comprende la secuencia SYGVH (SEQ ID NO: 30), GGSISSY (SEQ ID NO: 36), o GGSISSYGVH (SEQ ID NO: 37); (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia VIWTX₁GX₂TDYNSALMX₃ en donde X₁ es G o S; X₂ es S o V; X₃ es S o G (SEQ ID NO: 49), o WTX₁GX₂ en donde X₁ es G o S; X₂ es S o V (SEQ ID NO: 50); y (iii) una CDR3 VH que comprende la secuencia DYDRYTX₁DY en donde X₁ es E o M (SEQ ID NO: 82); y

(b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprenden (i) una CDR1 VL que comprende la secuencia RASKSVSTSX₁YSYMH, donde X₁ es G, L o N (SEQ ID NO: 63); (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia LASNLES (SEQ ID NO: 55); y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia QHSRELPYT (SEQ ID NO: 56), el anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno es conjugado para un agente, en donde el agente es seleccionado a partir del grupo que consta de un agente citotóxico, un agente inmunomodulador, un agente trazador para diagnóstico por imágenes, una proteína terapéutica, un biopolímero, y un oligonucleótido.

2. El conjugado de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque el agente citotóxico es MMAD (Monometil Auristatina D) o 0101 (2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-yl)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-yl]-N-metil-L-valinamida).

3. El conjugado de conformidad con la Reivindicación 2, caracterizado por que el conjugado comprende la fórmula: anticuerpo-(marcador que contiene glutamina donador de acilo)-(ligador)-(agente citotóxico).

4. El conjugado de conformidad con la Reivindicación 3, caracterizado porque el marcador que contiene glutamina donador de acilo comprende una secuencia de aminoácido GLLQGG (NO ID SEC: 78), LLQGA (SEQ ID NO: 79), LLQ, o

LLQX₁X₂X₃X₄X₅, en donde X₁ es G o P, en donde X₂ es A, G, P, o está ausente, en donde X₃ es A, G, K, P, o está ausente, en donde X₄ es G, K, o está ausente, y en donde X₅ es K o está ausente (SEQ ID NO: 88), y en donde el ligador comprende acetil-lisina-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo o amino-PEG6-propionilo.

5. El conjugado de conformidad con la Reivindicación 4, caracterizado porque el conjugado es seleccionado a partir del grupo que comprende 1) anticuerpo-LLQGA (SEQ ID NO: 79)-(acetil-lisina-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (AcLys-VC-PABC))-0101; 2) anticuerpo-LLQGA (SEQ ID NO: 79)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD; 3) anticuerpo-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-(AcLys-VC-PABC)-0101; 4) anticuerpo-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD; 5) anticuerpo-GLLQGG (SEQ ID NO: 78)-(AcLys-VC-PABC)-0101; y 6) anticuerpo-GLLQGG (SEQ ID NO: 78)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD y en donde el aminoácido lisina en el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo puede ser eliminado.

6. El conjugado de conformidad con la Reivindicación 5, caracterizado porque el conjugado 1) anticuerpo-GLLQGG (SEQ ID NO: 78)-(AcLys-VC-PABC)-0101; 2) anticuerpo-GLLQGG (SEQ ID NO: 78)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD; 3) anticuerpo-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-(AcLys-VC-PABC)-0101; 4) anticuerpo-LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (SEQ ID NO: 88)-(AcLys-VC-PABC)-MMAD; 5) anticuerpo-LLQGA (SEQ ID NO: 79)-(AcLys-VC-PABC)-0101; o 6) anticuerpo-LLQGA (SEQ ID NO: 79)-AcLys-VC-PABC-MMAD comprende una sustitución aminoácido a partir de lisina a arginina en la posición 222.

7. El conjugado de conformidad con la Reivindicación 3, caracterizado porque el conjugado comprende sustituciones aminoácido en la posición N297Q y K222R del anticuerpo, un ligador que comprende amino-PEG6-propionilo, y un agente citotóxico que comprende MMAD.

8. El conjugado de conformidad con la Reivindicación 3, donde el conjugado es un anticuerpo-LLQCA (SEQ ID NO: 79)-(AcLys-VC-PABC)-0101, donde el conjugado comprende sustituciones aminoácido a partir de lisina a arginina en la posición 222 del anticuerpo, y donde el aminoácido lisina en el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo es eliminado.

9. Un conjugado anticuerpo-fármaco el cual se enlaza de manera específica a la superficie celular del trofoblasto-2 (Trop-2), en donde el conjugado es un anticuerpo-LLQGA (SEQ ID NO:79)-(AcLys-VC-PABC)-0101, donde el anticuerpo comprende una

región variable de cadena pesada (VH) que comprenden (i) una región de determinación complementaria VH (CDR1) que comprende la secuencia SYGVH (SEQ ID NO: 30), GGSISY (SEQ ID NO: 36), o GGSISYGVH (SEQ ID NO: 37); (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia VIWTSGVTDYNSALMG (SEQ ID NO: 38), o WTSGV (SEQ ID NO: 39); y (iii) una CDR3 VH que comprende la secuencia DYDRYTMDY (SEQ ID NO: 35); y una región variable de cadena ligera (VL) que comprenden (i) una CDR1 VL que comprende la secuencia RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO: 54); (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia LASNLES (SEQ ID NO: 55); y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia QHSRELPYT (SEQ ID NO: 56), donde el conjugado comprende sustituciones aminoácido a partir de lisina a arginina en la posición 222 del anticuerpo, y donde el aminoácido lisina en el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo es eliminado.
