

CONJUGADO ANTICUERPO ANTI-TROP2-FÁRMACO

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un conjugado
5 anticuerpo-fármaco que tiene un fármaco antitumoral conjugado
a un anticuerpo anti-TROP2 vía una porción de estructura
ligadora, siendo útil el conjugado como un fármaco
antitumoral.

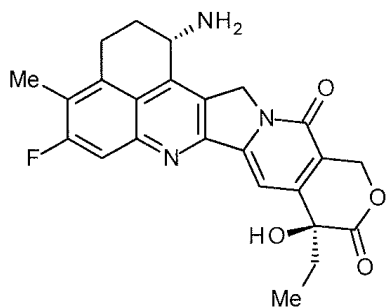
Antecedentes de la Invención

10 Un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC, por sus
siglas en Inglés) que tiene un fármaco con citotoxicidad
conjugado a un anticuerpo, cuyo antígeno es expresado sobre
una superficie de las células cancerosas y que también se
enlaza a un antígeno capaz de realizar la internalización
15 celular, y por lo tanto puede distribuir el fármaco
selectivamente hacia las células cancerosas y se espera de
este modo que provoque acumulación del fármaco dentro de las
células cancerosas y mate a las células cancerosas (ver,
Literaturas No de Patente 1 a la 3). Como un ADC, el Mylotarg
20 (Gemtuzumab ozogamicin (marca registrada)) en el cual la
caliqueamicina es conjugada a un anticuerpo anti-CD33 está
aprobado como un agente terapéutico para la leucemia mieloide
aguda. Además, el Adcetris (Brentuximab vedotin (marca
registrada)), en el cual la auristatina E está conjugada a un
25 anticuerpo anti-CD30, ha sido recientemente aprobado como un

agente terapéutico para el linfoma de Hodgkin y el linfoma macrocítico anaplásico (ver, Literatura No de Patente 4). Los fármacos contenidos en los ADCs que han sido probados hasta ahora se dirigen al ADN o a la tubulina.

5 Con respecto a un agente antitumoral, son conocidos los compuestos de bajo peso molecular, los derivados de camptotecina, compuestos que inhiben la topoisomerasa I para mostrar un efecto antitumoral. Entre ellos, un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula

10 Fórmula 1



15

(exatecán, nombre químico: (1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-diona) es un derivado soluble en agua de la camptotecina (Literatura de Patente 1 y 2). De manera contraria al irinotecán actualmente utilizado en ambientes clínicos, este compuesto no requiere una activación por una enzima para ejercer un efecto antitumoral. Además, la actividad inhibitoria sobre la topoisomerasa I es más alta que SN-38 que es una sustancia farmacéuticamente activa,

20

25

principal de irinotecán y topotecán, también utilizado en ambientes clínicos, y la actividad citocida más alta *in vitro* es obtenida contra diversas células cancerosas. En particular, esto muestra el efecto contra células cancerosas que tienen resistencia a SN-38 o similar, debido a la expresión de la P-glucoproteína. Además, en un modelo de ratón trasplantado subcutáneamente con tumor humano, éste mostró un efecto antitumoral potente, y de este modo ha sufrido los estudios clínicos, pero no ha sido puesto en el mercado todavía (ver, Literaturas No de Patente 5 a la 10). Sigue siendo no claro si el exatecán actúa o no efectivamente como un ADC.

DE-310 es un complejo en el cual el exatecán es conjugado a un polímero de carboximetildextrano-polialcohol biodegradable vía un espaciador peptídico GGFG (Literatura de Patente 3). Mediante la conversión del exatecán en una forma de un profármaco polimérico, puede ser mantenida una propiedad de alta retención sanguínea y también una propiedad altamente dirigible a un área tumoral, que es pasivamente incrementada por la utilización de la permeabilidad incrementada de los vasos sanguíneos recién formados dentro del tumor y la propiedad de retención en los tejidos tumores. Con DE-310, a través de una escisión del espaciador peptídico por una enzima, el exatecán y el exatecán con glicina conectada a un grupo amino, son continuamente liberados como

una sustancia activa principal. Como resultado, se mejora la farmacocinética. Se encontró que DE-310 tiene una efectividad más alta que el exatecán administrado solo, aun cuando la cantidad total del exatecán contenido en éste sea menor que el caso de la administración del exatecán solo de acuerdo a diversos modelos de evaluación tumoral en estudios no clínicos. Un estudio clínico fue conducido para DE-310, y también fueron confirmados casos efectivos, en los cuales estuvo presente un reporte que sugiere que la sustancia activa principal se acumula en un tumor más que en los tejidos normales, sin embargo, existe también un reporte que indica que la acumulación de DE-310 y la sustancia activa principal en un tumor no es muy diferente de la acumulación en tejidos normales en humanos, y de este modo, no se observa dirección pasiva al objetivo en humanos (ver, Literaturas No de Patente 11 a la 14). Como resultado, DE-310 tampoco fue comercializado, y sigue siendo no claro si el exatecán actúa o no efectivamente como un fármaco dirigido a tal objetivo.

Como un compuesto relacionado a DE-310, un complejo en el cual una porción estructural representada por $\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})-$ es insertada entre el espaciador de $-\text{GGFG}-$ y el exatecán para formar un $-\text{GGFG}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})-$ utilizado como una estructura espaciadora, es también conocido (Literatura de Patente 4). Sin embargo, el efecto antitumoral de dicho complejo no es conocido del todo.

TROP2 humano (TACSTD2: transductor 2 de señal de calcio asociada al tumor, GA733-1, EGP-1, M1S1; de aquí en adelante, denominado como hTROP2) es una proteína de la membrana celular tipo 1 transmembranal de un solo paso, que
5 consiste de 323 residuos de aminoácidos. Mientras que la presencia de una proteína de la membrana celular involucrada en la resistencia inmunitaria, que es común a los trofoblastos humanos y a las células cancerosas (Literatura No de Patente 15), ha sido previamente sugerido, una molécula
10 de antígeno reconocida por un anticuerpo monoclonal (162-25.3 o 162-46.2) contra una proteína de membrana celular en una línea de células de coriocarcinoma humano, fue identificada y designada como TROP2, como una de las moléculas expresadas en los trofoblastos humanos (Literatura No de Patente 16). Esta
15 molécula fue también encontrada posteriormente por otros investigadores y también designada con un antígeno tumoral GA733-1, reconocida por un anticuerpo monoclonal de ratón GA733 (Literatura No de Patente 17) obtenida mediante inmunización con una línea de células de cáncer gástrico o
20 una glucoproteína epitelial (EGP-1; Literatura No de Patente 18) reconocida por un anticuerpo monoclonal de ratón RS7-3G11 obtenida mediante inmunización con células de cáncer pulmonar no microcítico. En 1995, no obstante, el gen TROP2 fue clonado, y se confirmó que todas estas moléculas son
25 moléculas idénticas (Literatura No de Patente 19). La

secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de hTROP2 están disponibles en una base de datos pública y pueden ser consultadas, por ejemplo, bajo los Nos. de Acceso NM_002353 y NP_002344 (NCBI).

5 El gen hTROP2 constituye la familia de genes TACSTD, junto con el gen de TROP-1 humano (EpCAM, EGP-2, TACSTD1) que tiene aproximadamente 50% de homología (Literatura No de Patente 21). La proteína hTROP2 está constituida por una secuencia de señal que consiste de 26
10 residuos de aminoácidos N-terminales, un dominio extracelular que consiste de 248 residuos de aminoácidos, un dominio transmembranal que consiste de 23 residuos de aminoácidos, y un dominio intracelular que consiste de 26 residuos de aminoácidos. El dominio extracelular tiene cuatro sitios de
15 glucosilación N-enlazados, y se sabe que tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 10 kD más el valor teórico calculado de 35 kD (Literatura No de Patente 19).

Tampoco ha sido identificado un ligando fisiológico de hTROP2, ni tampoco hasta ahora han sido reveladas sus
20 funciones moleculares. Se encontró que hTROP2 transduce las señales de calcio en células tumorales (Literatura No de Patente 20). Además, hTROP2 es fosforilado en un residuo intracelular de serina 303 por la proteína cinasa C, que es una cinasa dependiente de Ca^{2+} (Literatura No de Patente 18),
25 y tiene una secuencia de enlace a PIP_2 en el dominio

intracelular, sugiriendo las funciones de señalización de las células tumorales (Literatura No de Patente 22).

En el análisis inmunohistoquímico utilizando muestras clínicas, se encontró que hTROP2 es sobre-expresado en diversos carcinomas de células epiteliales y que es expresado en células epiteliales en tipos limitados de tejidos normales a un bajo nivel de expresión, en comparación con los tejidos tumorales (Literaturas No de Patente 23 a la 27). También, se reportó que la expresión de hTROP2 correlaciona con el pobre pronóstico del cáncer colorrectal (Literatura No de Patente 23), el cáncer gástrico (Literatura No de Patente 24), el cáncer pancreático (Literatura No de Patente 25), el cáncer oral (Literatura No de Patente 26), y el glioma (Literatura No de Patente 27).

A partir de los modelos que utilizan células de cáncer colorrectal, se reportó además que la expresión de hTROP2 está involucrada en el crecimiento de células independientes del andamiaje de las células tumorales, y la tumorigénesis en ratones inmunodeficientes (Literatura No de Patente 28).

En respuesta a tal información que sugiere la asociación con el cáncer, ha sido establecida una pluralidad de anticuerpos anti-hTROP2 hasta ahora, y han sido estudiados para sus efectos antitumorales. Entre esos anticuerpos, se describe, por ejemplo, un anticuerpo no conjugado que muestra

por sí mismo actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de ratón desnudo (Literaturas de Patentes 5 a la 8) así como un anticuerpo que muestra actividad antitumoral como ADC con un fármaco citotóxico (Literaturas de Patentes 9 a la 12).

5 Sin embargo, la fuerza o cobertura de su actividad todavía insuficiente, y existen necesidades médicas no satisfechas para hTROP2 como un objetivo terapéutico.

Lista de Citas

Literatura de Patentes

10 Literatura de Patente 1: Patente Japonesa Abierta al Público No. 5-59061

 Literatura de Patente 2: Patente Japonesa Abierta al Público No. 8-337584

 Literatura de Patente 3: Publicación Internacional
15 No. WO 1997/46260

 Literatura de Patente 4: Publicación Internacional No. WO 2000/25825

 Literatura de Patente 5: Publicación Internacional No. WO 2008/144891

20 Literatura de Patente 6: Publicación Internacional No. WO 2011/145744

 Literatura de Patente 7: Publicación Internacional No. WO 2011/155579

 Literatura de Patente 8: Publicación Internacional
25 No. WO 2013/077458

Literatura de Patente 9: Publicación Internacional
No. WO 2003/074566

Literatura de Patente 10: Publicación Internacional
No. WO 2011/068845

5 Literatura de Patente 11: Publicación Internacional
No. WO 2013/068946

Literatura de Patente 12: Patente de los Estados
Unidos No. 7999083

Literatura No de Patentes

10 Literatura No de Patente 1: Ducry, L., et al.,
Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.

Literatura No de Patente 2: Alley, S. C., et al.,
Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.

Literatura No de Patente 3: Damle N.K., Expert
15 Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.

Literatura No de Patente 4: Senter P. D., et al.,
Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.

Literatura No de Patente 5: Kumazawa, E., Tohgo,
A., Exp. Opin. Invest. Drugs (1998) 7, 625-632.

20 Literatura No de Patente 6: Mitsui, I., et al., Jpn
J. Cancer Res. (1995) 86, 776-782.

Literatura No de Patente 7: Takiguchi, S., et al.,
Jpn J. Cancer Res. (1997) 88, 760-769.

Literatura No de Patente 8: Joto, N. et al., Int J
25 Cancer (1997) 72, 680-686.

Literatura No de Patente 9: Kumazawa, E. et al.,
Cancer Chemother. Pharmacol. (1998) 42, 210-220.

Literatura No de Patente 10: De Jager, R., et al.,
Ann N Y Acad Sci (2000) 922, 260-273.

5 Literatura No de Patente 11: Inoue, K. et al.,
Polymer Drugs in the Clinical Stage, Editado por Maeda et al.
(2003), 145-153.

Literatura No de Patente 12: Kumazawa, E. et al.,
Cancer Sci (2004) 95, 168-175.

10 Literatura No de Patente 13: Soepenbergh, O. et al.,
Clinical Cancer Research, (2005) 11, 703-711.

Literatura No de Patente 14: Wente M. N. et al.,
Investigational New Drugs (2005) 23, 339-347.

15 Literatura No de Patente 15: Faulk WP, et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci. 75(4), 1947-1951 (1978).

Literatura No de Patente 16: Lipinski M, et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci. 78(8), 5147-5150 (1981).

Literatura No de Patente 17: Linnenbach A J, et
al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86(1), 27-31 (1989).

20 Literatura No de Patente 18: Basu A, et al., Int.
J. Cancer, 62(4), 472-479 (1995).

Literatura No de Patente 19: Fornaro M, et al.,
Int. J. Cancer, 62(5), 610-618 (1995).

25 Literatura No de Patente 20: Ripani E, et al., Int.
J. Cancer, 76(5), 671-676 (1998).

Literatura No de Patente 21: Calabrese G, et al.,
Cytogenet. Cell Genet., 92(1-2), 164-165 (2001).

Literatura No de Patente 22: El Sewedy T, et al.,
Int. J. Cancer, 75(2), 324-330 (1998).

5 Literatura No de Patente 23: Ohmachi T, et al.,
Clin. Cancer Res., 12(10), 3057-3063 (2006).

Literatura No de Patente 24: Muhlmann G, et al., J.
Clin. Pathol., 62(2), 152-158 (2009).

10 Literatura No de Patente 25: Fong D, et al., Br. J.
Cancer, 99(8), 1290-1295 (2008).

Literatura No de Patente 26: Fong D, et al., Mod.
Pathol., 21(2), 186-191 (2008).

Literatura No de Patente 27: Ning S, et al.,
Neurol. Sci., 34(10), 1745-1750 (2013).

15 Literatura No de Patente 28: Wang J, et al., Mol.
Cancer Ther., 7(2), 280-285 (2008).

Breve Descripción de la Invención

PROBLEMA TÉCNICO

20 Con respecto al tratamiento del tumor por un
anticuerpo, puede ser observado un efecto antitumoral
insuficiente incluso cuando el anticuerpo reconoce un
antígeno que se enlaza a las células tumorales, y existe un
caso en el cual es necesario un anticuerpo antitumoral más
efectivo. Además, muchos compuestos antitumorales de bajo
25 peso molecular tienen un problema en seguridad como el efecto

colateral y la toxicidad, incluso los compuestos tienen un excelente efecto antitumoral, sigue siendo un objetivo lograr un efecto terapéutico superior por el aumento adicional de la seguridad. De este modo, un objetivo de la presente
5 invención es proporcionar un fármaco antitumoral que tiene un excelente efecto terapéutico, el cual es excelente en términos de efecto antitumoral y de seguridad.

Los inventores pensaron que, cuando un compuesto antitumoral el exatecán, es convertido a un conjugado
10 anticuerpo-fármaco, vía una porción estructural ligadora, mediante conjugación al anticuerpo anti-TROP2, el cual es capaz de dirigirse a las células tumorales, es decir que tiene una propiedad capaz de reconocer las células tumorales, una propiedad capaz de enlazarse a las células tumorales, una
15 propiedad de internalización dentro de las células tumorales, o similar, la actividad citocida basada en el anticuerpo puede ser adquirida, el compuesto antitumoral puede ser más seguramente distribuido a las células tumorales para mostrar de manera específica el efecto antitumoral del compuesto en
20 las células tumorales, y de este modo el efecto antitumoral puede ser exhibido de manera segura, y una dosis del compuesto antitumoral puede ser reducida en comparación a un caso de administración del compuesto solo, y de este modo una influencia del compuesto antitumoral sobre las células
25 normales puede ser aliviada, de modo que puede ser lograda

una seguridad más alta.

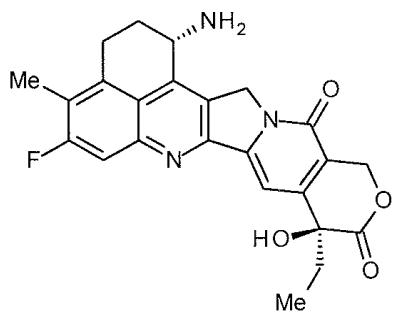
En este contexto, los inventores crearon un ligador con una estructura específica, y tuvieron éxito en la obtención de un conjugado anticuerpo-fármaco, en el cual el anticuerpo anti-TROP2 y el exatecán son conjugados uno con el otro vía el ligador, y confirmaron un excelente efecto antitumoral mostrado por el conjugado, para completar con esto la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente.

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

Fórmula 2

15



20

está conjugado a un anticuerpo anti-TROP2 por un enlace tioéter que es formado en una porción de enlace disulfuro presente en una porción de bisagra del anticuerpo anti-TROP2 vía un ligador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

25 $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$

Aquí, el anticuerpo anti-TROP2 está conectado al extremo terminal de L^1 , el compuesto antitumoral está conectado al grupo carbonilo de la porción $-(CH_2)n^2-C(=O)-$ con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como la posición de conexión,

en donde

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

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

L^1 representa $-(\text{Succinimid-3-il-N})-(CH_2)n^3-C(=O)-$,

10 en donde n^3 representa un número entero de 2 a 8,

L^2 representa $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ o un enlace sencillo,

en donde n^4 representa un número entero de 1 a 6,

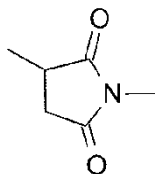
L^P representa un residuo peptídico que consiste de 15 2 a 7 aminoácidos,

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

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-$ tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

Fórmula 3

20



La cual está conectada al anticuerpo anti-TROP2 en la posición 3 del mismo, y está conectado a un grupo metileno en la estructura ligadora que contiene esta estructura sobre 25

el átomo de nitrógeno en la posición 1.

La presente invención se refiere además a cada uno de lo siguiente.

[2] El conjugado anticuerpo-fármaco de
 5 acuerdo a [1], en donde el residuo peptídico de L^P es un residuo peptídico que comprende un aminoácido seleccionado de fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico, y ácido aspártico.

10 [3] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad a [1] o [2], en donde L^P es un residuo peptídico seleccionado del siguiente grupo:

-GGF-,

-DGGF-,

15 - (D-) D-GGF-,

-EGGF-,

-GGFG-,

-SGGF-,

-KGGF-,

20 -DGGFG-,

-GGFGG-,

-DDGGFG-,

-KDGGFG-, y

-GGFGGGF-;

25 en donde "(D-)D" representa Ácido D-aspártico.

[4] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con [1] o [2], en donde L^P es un residuo peptídico que consiste de 4 aminoácidos.

[5] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [1] a [4], en donde L^P es un residuo tetrapeptídico de -GGFG-.

[6] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [1] a [5], en donde n^3 es un número entero de 2 a 5, y L^2 es un enlace sencillo.

[7] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [1] a [5], en donde n^3 es un número entero de 2 a 5, L^2 es $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})n^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$, y n^4 es 2 o 4.

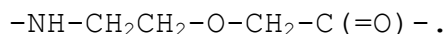
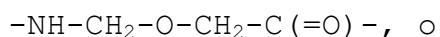
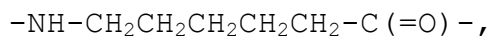
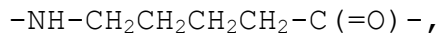
[8] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [1] a [7], en donde $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-\text{L}^a-(\text{CH}_2)n^2-\text{C}(=\text{O})-$ es una estructura parcial que tiene una longitud de cadena de 4 a 7 átomos.

[9] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [1] a [7], en donde $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-\text{L}^a-(\text{CH}_2)n^2-\text{C}(=\text{O})-$ es una estructura parcial que tiene una longitud de cadena de 5 o 6 átomos.

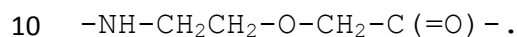
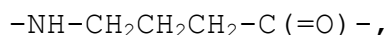
[10] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [1] a [9], en donde $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-\text{L}^a-(\text{CH}_2)n^2-\text{C}(=\text{O})-$ es

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,

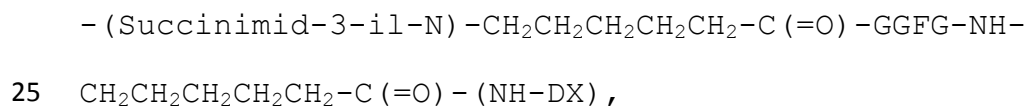
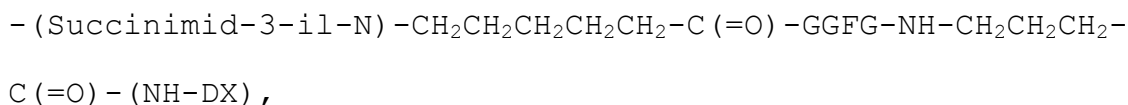
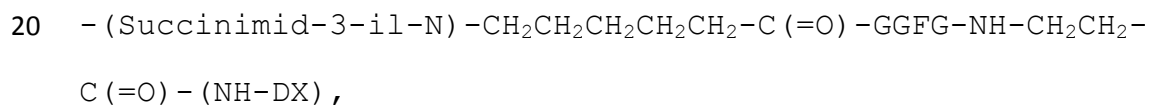
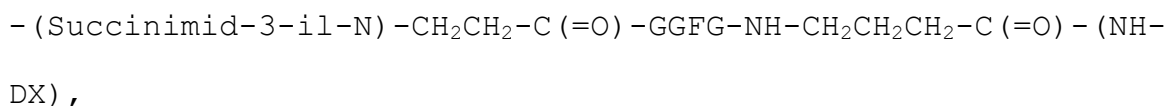
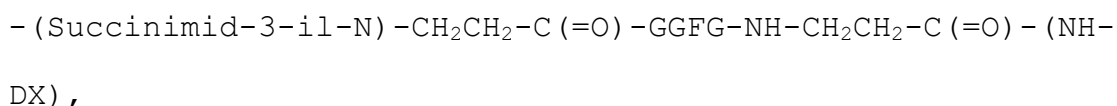
$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,



5 [11] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [1] a [9], en donde $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ es



[12] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [1] a [9], en donde la porción estructural de fármaco-ligador que tiene un fármaco conectado a $-\text{L}^1-\text{L}^2-\text{L}^p-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ es una estructura de fármaco-ligador seleccionada del siguiente grupo:



- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-
C(=O) - (NH-DX) ,

- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O) - (NH-DX) ,

5 - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-
C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,

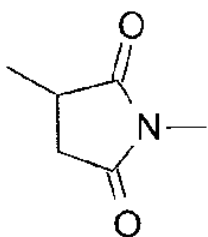
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-
C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,

- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
10 CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,

- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) .

En donde -(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

15 Fórmula 4

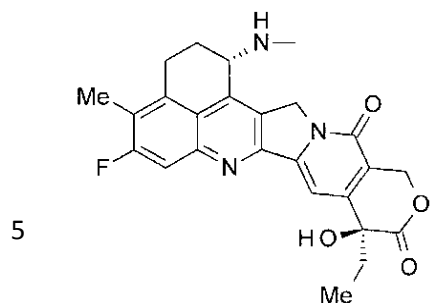


20 la cual está conectada al anticuerpo anti-TROP2 en la posición 3 del mismo y está conectado a un grupo metileno en la estructura ligadora que contiene esta estructura sobre el átomo de nitrógeno en la posición 1,

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

25 fórmula:

Fórmula 5



en donde el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es una posición de conexión, y -GGFG- representa un residuo tetrapeptídico de -Gly-Gly-Phe-Gly-.

10

[13] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [1] a la [9], en donde la porción estructural fármaco-ligador que tiene un fármaco conectado a $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ es una estructura de fármaco-ligador seleccionado del siguiente grupo:

15

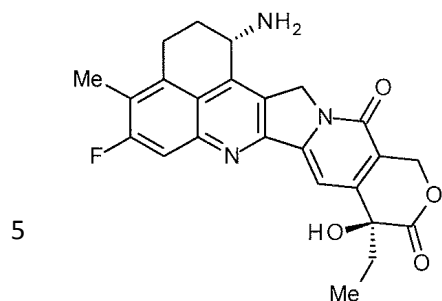
- (Succinimid-3-il-N) - $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$ - $C(=O)$ - GGFG - $NH-CH_2-O-CH_2-C(=O) - (NH-DX)$,
- (Succinimid-3-il-N) - $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$ - $C(=O)$ - GGFG - $NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O) - (NH-DX)$,
- 20 - (Succinimid-3-il-N) - $CH_2CH_2-C(=O) - NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O) - GGFG - NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O) - (NH-DX)$.

Aquí, - (Succinimid-3-il-N) -, - (NH-DX) , y -GGFG- son como se definieron anteriormente.

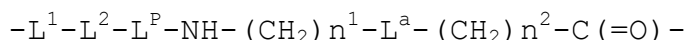
[14] Un conjugado anticuerpo-fármaco en donde un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula:

25

Fórmula 6



está conjugado a un anticuerpo anti-TROP2 por un enlace tioéter que es formado en una porción de enlace disulfuro presente en una parte de bisagra del anticuerpo anti-TROP2 vía un ligador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



en donde el anticuerpo anti-TROP2 está conectado al extremo terminal de L^1 , el compuesto antitumoral está conectado al grupo carbonilo de la porción $-(CH_2)^{n^2}-C(=O)-$, en donde

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

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

L^1 representa $-(\text{Succinimid-3-il-N})-(CH_2)^{n^3}-C(=O)-$,

en donde n^3 representa un número entero de 2 a 8,

L^2 representa $-NH-(CH_2CH_2-O)^{n^4}-CH_2CH_2-C(=O)-$ o un enlace sencillo,

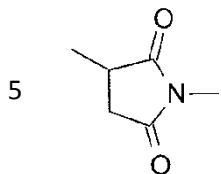
en donde n^4 representa un número entero de 1 a 6,

L^P representa un residuo tetrapeptídico de $-GGFG-$,

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

-(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

Fórmula 7



que está conectada al anticuerpo anti-TROP2 en la posición 3 del mismo, y está conectado a un grupo metileno en la estructura ligadora que contiene esta estructura sobre el
10 átomo de nitrógeno en la posición 1.

[15] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con [14], en donde

n^1 es 3, n^2 es 0, n^3 es 2, L^2 es $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$, n^4 es 2, y L^a es un enlace sencillo,

15 n^1 es 1, n^2 es 1, n^3 es 5, L^2 es un enlace sencillo, y L^a es $-O-$, o

n^1 es 2, n^2 es 1, n^3 es 5, L^2 es un enlace sencillo, y L^a es $-O-$.

[16] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad
20 con [14] o [15], en donde n^3 es 2 o 5, y L^2 es un enlace sencillo.

[17] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con [14] o [15], en donde n^3 es 2 o 5, L^2 es $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$, y n^4 es 2 o 4.

25 [18] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad

con cualquiera de [14] a [17], en donde $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ es

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,

$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$, o

5 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$.

[19] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [14] a [18], en donde la porción estructural fármaco-ligador que tiene un fármaco conectado a $-\text{L}^1-\text{L}^2-\text{L}^p-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ es una estructura de fármaco-ligador seleccionada del siguiente grupo:

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$,

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$,

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$

15 $\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$,

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$,

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$,

20 $-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$,

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$,

$-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$

25 $\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$,

- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX) ,

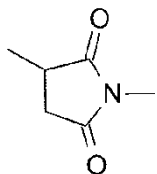
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX) ,

5 - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX) ;

en donde -(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

Fórmula 8

10



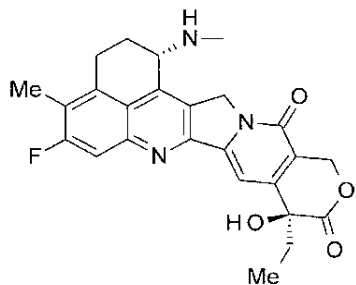
que está conectada al anticuerpo anti-TROP2 en la posición 3 del mismo, y está conectada a un grupo metileno en la estructura ligadora que contiene esta estructura sobre el átomo de nitrógeno en la posición 1,

15

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

Fórmula 9

20



25

en donde el átomo de nitrógeno del grupo amino en

la posición 1 es una posición de conexión, y

-GGFG- representa a residuo tetrapeptídico de -Gly-Gly-Phe-Gly-.

[20] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad
5 con cualquiera de [14] a [18], en donde la porción
estructural de fármaco-ligador que tiene un fármaco conectado
a $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ es una estructura de
fármaco-ligador seleccionada del siguiente grupo:

- (Succinimid-3-il-N) - $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-$
10 $C(=O)-(NH-DX)$,
- (Succinimid-3-il-N) - $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$
 $C(=O)-(NH-DX)$,
- (Succinimid-3-il-N) - $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-$
 $C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$.

15 Aquí, - (Succinimid-3-il-N)-, - (NH-DX) y -GGFG- son
como se definieron anteriormente.

[21] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad
con cualquiera de [1] a [20], en donde un número promedio de
unidades de una seleccionada de la estructura de fármaco-
20 ligador conjugado por anticuerpo, está en un intervalo de 1 a
10.

[22] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad
con cualquiera de [1] a [20], en donde un número promedio de
unidades de una seleccionada de la estructura de fármaco-ligador
25 conjugado por anticuerpo, está en un intervalo de 2 a 8.

[23] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [1] a [20], en donde un número promedio de unidades de una seleccionada de la estructura de fármaco-ligador conjugado por anticuerpo, está en un intervalo de 3 a 5 8.

[24] Un fármaco que contiene el conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [1] a [23], una sal del mismo o un hidrato del mismo.

[25] Un fármaco antitumoral y/o fármaco 10 anticanceroso que contiene el conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [1] a [23], una sal del mismo o un hidrato del mismo.

[26] El fármaco antitumoral y/o un fármaco anticanceroso de acuerdo a [25], el cual es aplicado al 15 cáncer pulmonar, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de mama, melanoma, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, o cáncer 20 esofágico.

[27] Una composición farmacéutica que contiene el conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con cualquiera de [1] a [23], una sal del mismo o un hidrato del mismo como un componente activo, y un componente de la formulación 25 farmacéuticamente aceptable.

[28] La composición farmacéutica de conformidad con [27], la cual es aplicada a cáncer pulmonar, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer
 5 pancreático, cáncer de mama, melanoma, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, o cáncer esofágico.

[29] Un método para tratar un tumor y/o el cáncer, que comprende administrar el conjugado anticuerpo-fármaco de
 10 conformidad con cualquiera de [1] a [23], una sal del mismo o un hidrato del mismo.

[30] Un método para producir un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende reaccionar un compuesto representado por la siguiente fórmula:

15 $(\text{maleimid-N-il})-(\text{CH}_2)_{n^3}-\text{C}(=\text{O})-\text{L}^2-\text{L}^p-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$

con un anticuerpo anti-TROP2 o un derivado reactivo del mismo y una porción de fármaco-ligador conjugada del anticuerpo para un método para formar un enlace tioéter en un
 20 sitio de enlace de disulfuro presente en una parte de bisagra del anticuerpo.

En la fórmula, n^3 representa un número entero de 2 a 8,

L^2 representa $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ o un
 25 enlace sencillo,

en donde n^4 representa un número entero de 1 a 6,

L^P representa un residuo peptídico que consiste de 2 a 7 aminoácidos seleccionados de fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico, y ácido aspártico,

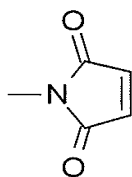
n^1 representa un número entero de 0 a 6,

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

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

(maleimid-N-il)- es un grupo representado por la siguiente fórmula:

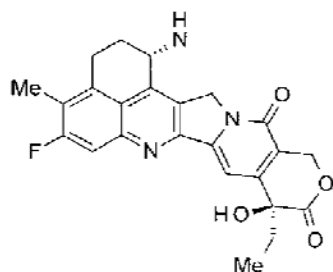
Fórmula 10



en donde el átomo de nitrógeno es una posición de conexión.

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

Fórmula 11



en donde el átomo de nitrógeno del grupo amino en

la posición 1 es una posición de conexión.

[31] El método de producción de conformidad con [30], en donde el método para conjugar una porción de fármaco-ligador a un anticuerpo anti-TROP2, es un método de
5 reducción del anticuerpo para convertir el anticuerpo a un derivado reactivo.

[32] El método de producción de conformidad con [30] o [31], en donde un número promedio de unidades de una estructura fármaco-ligador seleccionada, conjugada por
10 anticuerpo, está en un intervalo de 1 a 10.

[33] El método de producción de acuerdo a [30] o [31], en donde un número promedio de unidades de una estructura fármaco-ligador seleccionada, conjugada por anticuerpo, está en un intervalo de 2 a 8.

15 [34] El método de producción de acuerdo a [30] o [31], en donde un número promedio de unidades de una estructura fármaco-ligador seleccionada, conjugada por anticuerpo, está en un intervalo de 3 a 8.

[35] Un conjugado anticuerpo-fármaco obtenido
20 mediante el método de producción de conformidad con cualquiera de [30] a la [34].

[36] Un conjugado de anticuerpo-fármaco obtenido mediante la formación de un enlace tioéter en un sitio de enlace sulfuro en una parte de bisagra de un anticuerpo anti-
25 TROP2, en donde el anticuerpo anti-TROP2 es tratado en una

condición de reducción, y después de esto se hace reaccionar con un compuesto seleccionado del siguiente grupo:

- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- 5 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- 10 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) -
- 15 (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -
- (NH-DX) ,
- 20 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
- C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
- C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- 25 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O) - (NH-

- DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O) -
- 5 (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- 10 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -
- 15 GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- 20 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- 25 CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

5 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

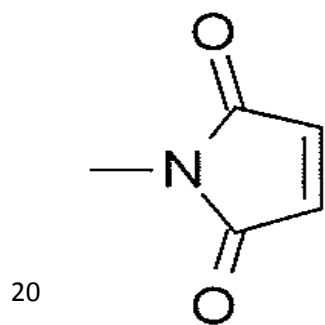
(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), y

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

En lo anterior, (maleimid-N-il)- es un grupo representado por la siguiente fórmula:

15 Fórmula 12

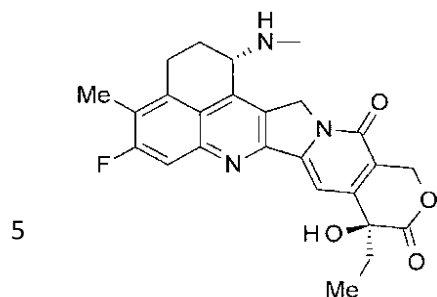


en donde el átomo de nitrógeno es una posición de conexión.

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

25

Fórmula 13



en donde el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es una posición de conexión.

-GGFG- representa un residuo tetrapeptídico de -
10 Gly-Gly-Phe-Gly-.

[37] Un conjugado anticuerpo-fármaco obtenido mediante la formación de un enlace tioéter en un sitio de enlace disulfuro presente en una parte de bisagra de un anticuerpo anti-TROP2, en donde el anticuerpo anti-TROP2 es
15 tratado en una condición de reducción y después de esto se hace reaccionar con un compuesto seleccionado del siguiente grupo:

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
20 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), y
(maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Aquí, (maleimid-N-il)-, -(NH-DX), y -GGFG- son como
25 se definieron anteriormente.

[38] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con [36] o [37], en donde un número promedio de unidades de una estructura de fármaco-ligador seleccionada, conjugada por anticuerpo, está en un intervalo de 1 a 10.

5 [39] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con [36] o [37], en donde un número promedio de unidades de una estructura de fármaco-ligador seleccionada, conjugada por anticuerpo, está en un intervalo de 2 a 8.

10 [40] El conjugado anticuerpo-fármaco de conformidad con [36] o [37], en donde un número promedio de unidades de una estructura de fármaco-ligador seleccionada, conjugada por anticuerpo, está en un intervalo de 3 a 8.

Efectos Ventajosos de la Invención

15 Con un conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco que tiene un compuesto antitumoral exatecán conjugado vía un ligador con una estructura específica, puede ser logrado un excelente efecto antitumoral y una excelente seguridad.

Breve Descripción de las Figuras

20 La Figura 1 muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 7) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de una cadena pesada del anticuerpo cTINA1.

La Figura 2 muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 9) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de una cadena ligera del anticuerpo cTINA1.

25 La Figura 3 muestra una secuencia nucleotídica (SEQ

ID NO: 11) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de una cadena pesada de hTINA1-H1.

La Figura 4 muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 13) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de una cadena pesada de hTINA1-H2.

La Figura 5 muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 15) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de una cadena pesada de hTINA1-H3.

La Figura 6 muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 17) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 18) de una cadena ligera de hTINA1-L1.

La Figura 7 muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 19) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 20) de una cadena ligera de hTINA1-L2.

La Figura 8 muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 21) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 22) de una cadena ligera de hTINA1-L3.

La Figura 9 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 23) de CDRH1 de un anticuerpo TINA1, una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 24) de CDRH2 del mismo, una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 25) de CDRH3 del mismo, una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 26) de CDRL1 del mismo, una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 27) de CDRL2 del mismo, y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 28) de CDRL3 del mismo.

La Figura 10 muestra la habilidad de internalización celular de un anticuerpo anti-CD9, un anticuerpo anti-CD46, un anticuerpo anti-CD55, un anticuerpo anti-CD59, un anticuerpo anti-CD71, un anticuerpo anti-CD73, 5 un anticuerpo anti-CD147, un anticuerpo anti-CD276, un anticuerpo anti-EpCAM, un anticuerpo anti-EGFR, y un anticuerpo anti-TROP2 (anticuerpo TINA1).

La Figura 11 muestra la habilidad de internalización celular de un anti-CD59 anticuerpo, un 10 anticuerpo anti-CD71, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EpCAM, y un anticuerpo anti-TROP2 (anticuerpo TINA1).

La Figura 12 muestra la habilidad de internalización celular de diversos anticuerpos anti-TROP2.

La Figura 13 muestra el efecto antitumoral de un 15 conjugado anticuerpo-fármaco (1), (6), o (12) sobre una línea de células de cáncer colorrectal humana COLO205, subcutáneamente trasplantada en ratones BALB/c-nu/nu.

La Figura 14 muestra el efecto antitumoral del conjugado anticuerpo-fármaco (1), (6), o (12) sobre una línea 20 celular de adenocarcinoma pancreático humano BxPC-3 subcutáneamente trasplantada en ratones BALB/c-nu/nu.

La Figura 15 muestra el efecto antitumoral del conjugado anticuerpo-fármaco (1), (6), o (12) sobre una línea 25 celular de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 subcutáneamente trasplantada en ratones BALB/c-nu/nu.

La Figura 16 muestra el efecto antitumoral del conjugado anticuerpo-fármaco (2), (5), (7), o (10) sobre una línea de células de cáncer colorrectal humana COLO205 subcutáneamente trasplantada en ratones BALB/c-nu/nu.

5 La Figura 17 muestra el efecto antitumoral del conjugado anticuerpo-fármaco (2), (5), (7), o (10) sobre una línea celular de adenocarcinoma pancreático humano BxPC-3 subcutáneamente trasplantada en ratones BALB/c-nu/nu.

10 La Figura 18 muestra el efecto antitumoral del conjugado anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), o (9) sobre una línea de células de cáncer colorrectal humana COLO205 subcutáneamente trasplantada en ratones BALB/c-nu/nu.

15 La Figura 19 muestra el efecto antitumoral del conjugado anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), o (9) sobre una línea celular de adenocarcinoma pancreático humano BxPC-3 subcutáneamente trasplantada en ratones BALB/c-nu/nu.

20 La Figura 20 muestra el efecto antitumoral del conjugado anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), o (9) sobre una línea celular de cáncer de ovario humano NIH:OVCA-3 subcutáneamente trasplantada en ratones BALB/c-nu/nu.

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

25 La Figura 22 muestra el efecto antitumoral del

conjugado anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), o (9) sobre una línea celular de cáncer pulmonar humano NCI-H292 subcutáneamente trasplantada en ratones BALB/c-nu/nu.

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

La Figura 24 muestra el efecto antitumoral del
conjugado anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), o (9) sobre una
10 línea celular de adenocarcinoma pancreático humano CFPAC-1 subcutáneamente trasplantada en ratones BALB/c-nu/nu.

La Figura 25 muestra el efecto antitumoral del
conjugado anticuerpo-fármaco (8) o (13) sobre una línea
celular de adenocarcinoma pancreático humano CFPAC-1
15 subcutáneamente trasplantada en ratones BALB/c-nu/nu.

La Figura 26 muestra el efecto antitumoral del
conjugado anticuerpo-fármaco (8) o (13) sobre una línea
celular de adenocarcinoma pancreático humano HPAC
subcutáneamente trasplantada en ratones BALB/c-nu/nu.

20 La Figura 27 muestra el efecto antitumoral del
conjugado anticuerpo-fármaco (8) o (13) sobre tejidos de
cáncer esofágico humano subcutáneamente trasplantados sobre
ratones NOD-scid.

Descripción Detallada de la Invención

25 De aquí en adelante, se describirán los modos

preferidos para llevar a cabo la presente invención, con referencia a las figuras. Las modalidades descritas más adelante son dadas como ejemplos típicos de las modalidades de la presente invención y no están destinadas a limitar el
5 alcance de la presente invención.

El conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención es un fármaco antitumoral en el cual un anticuerpo anti-TROP2 es conjugado a un compuesto antitumoral vía una porción estructural ligadora y explicado con detalle
10 más adelante en la presente.

Anticuerpo

El anticuerpo anti-TROP2 utilizado en el conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención puede ser derivado de cualquier especie, y los ejemplos preferidos
15 de las especies pueden incluir humanos, ratas, ratones, y conejos. En el caso cuando se deriven de otras especies no humanas, éste es preferentemente quimerizado o humanizado utilizando una técnica bien conocida. El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un
20 anticuerpo monoclonal y es preferentemente un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo anti-TROP2 es capaz de dirigirse a las células tumorales, es decir, tiene una propiedad capaz de reconocer una célula tumoral, una propiedad capaz de
25 enlazarse a una célula tumoral, una propiedad de

internalización en una célula tumoral, o similar, y puede ser convertido en un conjugado anticuerpo-fármaco mediante conjugación a un compuesto que tiene actividad antitumoral vía un ligador.

5 La actividad de enlace del anticuerpo contra las células tumorales puede ser confirmada utilizando citometría de flujo. Los ejemplos del método para confirmar la internalización del anticuerpo dentro de las células tumorales pueden incluir (1) un ensayo de visualización de un anticuerpo incorporada en las células bajo un microscopio de fluorescencia, utilizando un anticuerpo secundario (fluorescentemente marcado) que se enlaza al anticuerpo terapéutico (Cell Death y Differentiation (2008) 15, 751-761), (2) un ensayo de medición de una intensidad de fluorescencia incorporada en las células, utilizando un anticuerpo secundario (fluorescentemente marcado) que se enlaza al anticuerpo terapéutico (Molecular Biology of the Cell, Vol. 15, 5268-5282, Diciembre del 2004), o (3) un ensayo Mab-ZAP utilizando una inmunotoxina que se enlaza al anticuerpo terapéutico, en donde la toxina es liberada después de la incorporación dentro de las células para inhibir el crecimiento celular (Bio Techniques 28: 162-165, Enero del 2000). Una proteína compleja recombinante de una región catalítica de la toxina de difteria y la proteína G, puede ser utilizada como la inmunotoxina.

Ya que el fármaco conjugado en el conjugado anticuerpo-fármaco ejerce un efecto antitumoral, se prefiere, pero no es esencial que el anticuerpo mismo deba tener un efecto antitumoral. Para el propósito de ejercer específica
5 y selectivamente la actividad citocida del compuesto antitumoral sobre las células tumorales, es importante y también se prefiere que el anticuerpo deba tener la propiedad de internalización para migrar dentro de las células tumorales.

10 El anticuerpo anti-TROP2 puede ser obtenido utilizando un método usualmente llevado a cabo en la técnica, el cual involucra la inmunización de animales con un polipéptido antigénico y la recolección y purificación de los anticuerpos producidos *in vivo*. El origen del antígeno no
15 está limitado a humanos, y los animales pueden ser inmunizados con un antígeno derivado de un animal no humano, tal como ratón, una rata y similar. En este caso, la reactividad cruzada de los anticuerpos que se enlazan al antígeno heterólogo obtenido, con los antígenos humanos,
20 puede ser probada para seleccionar un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

Alternativamente, las células productoras de anticuerpo que producen los anticuerpos contra el antígeno, son fusionadas con células de mieloma de acuerdo a un método
25 conocido en la técnica (por ejemplo, Kohler y Milstein,

Nature (1975) 256, p. 495-497; y Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)) para establecer los hibridomas, de los cuales los anticuerpos monoclonales pueden ser a su vez obtenidos.

5 El antígeno puede ser obtenido al manipular mediante ingeniería genética las células hospederas para producir un gen que codifica para la proteína antigénica. Específicamente, los vectores que permiten la expresión del gen del antígeno son preparados y transferidos a las células
10 hospederas, de modo que el gen es expresado. El antígeno expresado de este modo puede ser purificado. El anticuerpo puede ser también obtenido utilizando un método de inmunización de los animales con las células que expresan el antígeno, manipulado por ingeniería genética, anteriormente
15 descritas, o una línea celular que expresa el antígeno.

El anticuerpo anti-TROP2 puede ser obtenido mediante un procedimiento conocido en la técnica.

El anticuerpo anti-TROP2 que puede ser utilizado en la presente invención no está particularmente limitado, y,
20 por ejemplo, aquellos especificados por las secuencias de aminoácidos mostradas en el listado de secuencias de la presente solicitud pueden ser preferentemente utilizadas. El anticuerpo anti-TROP2 utilizado en la presente invención tiene preferentemente las propiedades como se describen más
25 adelante.

(1) Un anticuerpo que tiene las siguientes propiedades:

(a) se enlaza específicamente a TROP2, y

(b) tiene una actividad de internalización en células que expresan TROP2 mediante el enlace a TROP2.

5 (2) El anticuerpo de acuerdo a (1), en donde TROP2 es TROP2 humano.

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

20 (4) El anticuerpo de acuerdo a cualquiera de (1) a (3), en donde la región constante del mismo es una región constante derivada de humano.

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

25 (6) El anticuerpo de acuerdo a (5), en donde el anticuerpo

tiene una región variable de cadena pesada que comprende una
secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste
de (a) una secuencia de aminoácidos descritas en las
posiciones de aminoácidos 20 a 140 en la SEQ ID NO: 12, (b)
5 una secuencia de aminoácidos descritas en las posiciones de
aminoácidos 20 a 140 en la SEQ ID NO: 14, (c) una secuencia
de aminoácidos descritas en las posiciones de aminoácidos 20
a 140 en la SEQ ID NO: 16, (d) una secuencia de aminoácidos
que tiene al menos 95% o más de homología a cualquiera de las
10 secuencias (a) a la (c), y (e) una secuencia de aminoácidos
derivada de cualquiera de las secuencias (a) a la (c) por las
supresiones, reemplazos, o adiciones de al menos un
aminoácido, y una región variable de cadena ligera que
comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo
15 que consiste de (f) una secuencia de aminoácidos descritas en
las posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID
NO: 18, (g) una secuencia de los aminoácidos descritas en las
posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID NO:
20, (h) una secuencia de los aminoácidos descritas en las
20 posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID NO:
22, (i) una secuencia de los aminoácidos que tiene al menos
95% o más de homología a cualquiera de las secuencias (f) a
(h), y (j) una secuencia de los aminoácidos derivada de
cualquiera de las secuencias (f) a (h) por las supresiones,
25 reemplazos, o adiciones de al menos un aminoácido.

(7) El anticuerpo de acuerdo a (6), en donde el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste de una región variable de cadena pesada que
5 comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 140 en la SEQ ID NO: 12 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID NO: 18, una región
10 variable de cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 140 en la SEQ ID NO: 12 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en
15 la SEQ ID NO: 20, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 140 en la SEQ ID NO: 12 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de
20 los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID NO: 22, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 140 en la SEQ ID NO: 14 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos
25 descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en

la SEQ ID NO: 18, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 140 en la SEQ ID NO: 14 y una región variable de cadena ligera que comprende una
5 secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID NO: 20, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 140 en la SEQ ID NO: 14 y una región variable de cadena
10 ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID NO: 22, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 140 en la SEQ ID NO: 16
15 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID NO: 18, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20
20 a la 140 en la SEQ ID NO: 16 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID NO: 20, y a región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las
25 posiciones de los aminoácidos 20 a la 140 en la SEQ ID NO: 16

y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID NO: 22.

(8) El anticuerpo de acuerdo a (7), en donde el anticuerpo
5 tiene una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 140 en la SEQ ID NO: 12 y una región
10 variable de cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID NO: 18, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 140 en
15 la SEQ ID NO: 14 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID NO: 18, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de
20 los aminoácidos 20 a la 140 en la SEQ ID NO: 14 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID NO: 20, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos
25 descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 140 en

la SEQ ID NO: 16 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 129 en la SEQ ID NO: 22.

- 5 (9) El anticuerpo de acuerdo a (6) o (7), en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste de una cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 470 en la SEQ ID NO: 12
- 10 y una cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 234 en la SEQ ID NO: 18, una cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 470 en la SEQ ID NO: 12 y una
- 15 cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 234 en la SEQ ID NO: 20, una cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 470 en la SEQ ID NO: 12 y una cadena
- 20 ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 234 en la SEQ ID NO: 22, una cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 470 en la SEQ ID NO: 14 y una cadena
- 25 ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos

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

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

10 ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 234 en la SEQ ID NO: 22, una cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 470 en la SEQ ID NO: 16 y una cadena

15 ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a 234 en la SEQ ID NO: 18, una cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 470 en la SEQ ID NO: 16 y una cadena

20 ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 234 en la SEQ ID NO: 20, y una cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 470 en la SEQ ID NO: 16 y una cadena

25 ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos

descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 234 en la SEQ ID NO: 22.

(10) El anticuerpo de acuerdo a (6) o (7), en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste de una cadena pesada que comprende la secuencia de los aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende la secuencia de los aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 18, una cadena pesada que comprende la secuencia de los aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende la secuencia de los aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20, una cadena pesada que comprende la secuencia de los aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende la secuencia de los aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 22, una cadena pesada que comprende la secuencia de los aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende la secuencia de los aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 18, una cadena pesada que comprende la secuencia de los aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende la secuencia de los aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20, una cadena pesada que comprende la secuencia de los aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende la secuencia de los aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 22, una cadena pesada que

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

(11) El anticuerpo de acuerdo a (8), en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste de una cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 470 en la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 234 en la SEQ ID NO: 18, una cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 470 en la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 21 a la 234 en la SEQ ID NO: 18, una cadena pesada que comprende una secuencia de los aminoácidos descritas en las posiciones de los aminoácidos 20 a la 470 en la SEQ ID NO: 14 y una cadena

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

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

(13) Un anticuerpo obtenido mediante un método para producir el anticuerpo de acuerdo a cualquiera de (1) al (12), el método que comprende los pasos de: cultivar una célula hospedera transformada con un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica para el anticuerpo; y recolectar el anticuerpo de interés a partir de los cultivos obtenidos en el paso precedente.

De aquí adelante, el anticuerpo anti-TROP2 utilizado en la invención es descrito.

Los términos "cáncer" y "tumor" como se utilizan en la presente son utilizados con el mismo significado.

El término "gen" como se utilizan en la presente incluye no solamente el ADN, sino también el mRNA del mismo, el cADN del mismo, y el cARN del mismo.

El término "polinucleótido" como se utiliza en la presente, es utilizado con el mismo significado que el ácido nucleico y también incluye el ADN, ARN, sondas, oligonucleótidos, y cebadores.

5 Los términos "polipéptido" y "proteína" como se utilizan en la presente son utilizados sin distinción.

El término "célula" como se utiliza en la presente también incluye las células en un individuo animal y las células cultivadas.

10 El término "TROP2" como se utiliza aquí es utilizado en el mismo sentido que la proteína TROP2.

El término "CDR" como se utiliza en la presente, se refiere a una región con determinación de la complementariedad (CDR). Se sabe que cada cadena pesada y
15 cadena ligera de una molécula de anticuerpo tiene tres regiones de determinación de la complementariedad (CDRs). La CDR es también llamada el dominio hipervariable, y está presente en una región variable de cada cadena pesada y ligera de un anticuerpo. Éste es un sitio que tiene
20 variabilidad inusualmente alta en su estructura primaria, y existen tres CDRs separadas en la estructura primaria de cada cadena polipeptídica pesada y ligera. En esta especificación, como para las CDRs de un anticuerpo, las CDRs de la cadena pesada son representadas por CDRH1, CDRH2, y
25 CDRH3 desde el lado amino-terminal de la secuencia de los

aminoácidos de la cadena pesada, y las CDRs de la cadena ligera son representadas por CDRL1, CDRL2, y CDRL3 desde el lado amino-terminal de la secuencia de los aminoácidos de la cadena ligera. Estos sitios están próximos uno al otro en la estructura terciaria, y determinan la especificidad para un antígeno al cual se enlaza el anticuerpo.

La frase "la hibridación es realizada bajo condiciones estrictas" como se utiliza en la presente, se refiere a un proceso en el cual la hibridación es realizada bajo condiciones bajo las cuales la identificación puede ser lograda por la realización de la hibridación a 68°C en una solución de hibridación comercialmente disponible ExpressHyb Hybridization Solution (fabricada por Clontech, Inc.) o mediante la realización de la hibridación a 68 °C en presencia de cloruro de sodio 0.7 a 1.0 M utilizando un filtro que tiene ADN inmovilizado sobre el mismo, seguido por la realización de lavado a 68 °C utilizando 0.1 a 2 x solución SSC (1 x solución SSC está compuesta de NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM) o bajo condiciones equivalentes a las mismas.

1. TROP2

TROP2 es un miembro de la familia TACSTD expresada en trofoblastos humanos y es una proteína de la membrana celular tipo 1, transmembranal de un solo paso, involucrada en la resistencia inmunitaria, la cual es común a los

trofoblastos humanos y a las células cancerosas.

Respecto a la proteína TROP2 que va a ser utilizada en la invención, la proteína TROP2 puede ser directamente purificada a partir de las células que expresan TROP2 de un humano o un mamífero no humano (tal como una rata o un ratón) y utilizadas, o una fracción de la membrana celular de las células anteriormente descritas puede ser preparada y utilizada. Además, TROP2 puede ser obtenida mediante síntesis *in vitro* de la misma o la producción de la misma en una célula hospedera a través de ingeniería genética. En la ingeniería genética, específicamente, después de que cADN de TROP2 es integrado dentro de un vector capaz de expresar el cADN de TROP2, la proteína TROP2 puede ser obtenida mediante la síntesis de ésta en una solución que contiene una enzima, un sustrato y una sustancia energética requerida para la transcripción y la traducción, o por la expresión de TROP2 en otra célula hospedera transformada, procariótica o eucariótica. Alternativamente, las células que expresan TROP2, manipuladas por ingeniería genética, anteriormente descritas, o una línea celular que expresa TROP2, pueden ser utilizadas como la proteína TROP2.

La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácido de TROP2 están disponibles en una base de datos pública y pueden ser referidas, por ejemplo, bajo los Nos. de Acceso NM_002353 y NP_002344 (NCBI).

Además, una proteína que consiste de una secuencia de los aminoácidos en donde uno o varios aminoácidos son sustituidos, suprimidos y/o agregados en cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriormente descritas de TROP2, y
5 también tiene una actividad biológica equivalente a aquella de la proteína, es también incluida en TROP2.

La proteína TROP2 humana está constituida por una secuencia de señal que consiste de los 26 residuos de aminoácidos N-terminales, un dominio extracelular que
10 consiste de 248 residuos de aminoácidos, un dominio transmembranal que consiste de 23 residuos de aminoácidos, y un dominio intracelular que consiste de 26 residuos de aminoácidos.

2. Producción de anticuerpo anti-TROP2

15 El anticuerpo contra TROP2 de la invención puede ser obtenido utilizando un método usualmente llevado en la técnica, el cual involucra la inmunización de un animal con TROP2 o un polipéptido arbitrario seleccionado de la secuencia de aminoácidos de TROP2, y la recolección y la
20 purificación del anticuerpo producido *in vivo*. La especie biológica de TROP2 que va a ser utilizada como un antígeno, no está limitada a un ser humano, y un animal puede ser inmunizado con TROP2 derivado de un animal diferente de los humanos, tal como un ratón o una rata. En este caso,
25 mediante el examen de la reactividad cruzada entre un

anticuerpo que se enlaza a la TROP2 heteróloga obtenida y la TROP2 humana, un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana puede ser seleccionado.

Además, un anticuerpo monoclonal puede ser obtenido
5 a partir de un hibridoma establecido mediante la fusión de las células productoras de anticuerpo que producen un anticuerpo contra TROP2 con células de mieloma de acuerdo a un método conocido (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, (1975) 256, pp. 495-497; Kennet, R. ed., Monoclonal
10 Antibodies, pp. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)).

TROP2 que va a ser utilizado como un antígeno puede ser obtenido mediante la expresión del gen TROP2 en una célula hospedera utilizando ingeniería genética.

Específicamente, un vector capaz de expresar el gen
15 de TROP2 es producido, y el vector resultante es transfectado dentro de una célula hospedera para expresar el gen, y luego, la TROP2 expresada es purificada.

Alternativamente, las células que expresan TROP2, manipuladas por ingeniería genética, anteriormente descritas,
20 o una línea celular que expresa TROP2 pueden ser utilizadas como la proteína TROP2. De aquí en adelante, se describe específicamente un método de obtención de un anticuerpo contra TROP2.

(1) Preparación del antígeno

25 Los ejemplos del antígeno que va a ser utilizado

para producir el anticuerpo anti-TROP2 incluyen TROP2, o un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácidos parcial que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de TROP2, o un derivado obtenido mediante la adición de una
5 secuencia de aminoácidos dada o un portador para la misma.

TROP2 puede ser purificada directamente a partir de los tejidos tumorales humanos o las células tumorales, y utilizada. Además, TROP2 puede ser obtenida mediante la síntesis de la misma *in vitro* o al producirla en una célula
10 hospedera mediante ingeniería genética.

Con respecto a la ingeniería genética, específicamente, después de que cADN de TROP2 es integrado dentro de un vector que es capaz de expresar el cADN de TROP2, el antígeno puede ser obtenido mediante la síntesis de
15 éste en una solución que contiene una enzima, un sustrato y una sustancia energética requerida para la transcripción y la traducción, o mediante la expresión de TROP2 en otra célula hospedera, transformada, procariótica o eucariótica.

Además, el antígeno puede ser obtenido como una
20 proteína secretora mediante la expresión de una proteína de fusión obtenida mediante la ligadura del dominio extracelular de TROP2, que es una proteína membranal, a la región constante de un anticuerpo en un sistema hospedero-vector, apropiado.

25 El cADN de TROP2 puede ser obtenido mediante, por

ejemplo, un denominado método de PCR en el cual es realizada una reacción en cadena de polimerasa (de aquí en adelante denominada como "PCR"; ver Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, pp. 487-489) utilizando una biblioteca de cADN
5 que expresa el cADN de TROP2 como una plantilla y los cebadores que amplifican específicamente el cADN de TROP2.

Respecto a la síntesis *in vitro* del polipéptido, por ejemplo, puede ser ejemplificado el Sistema de Traducción Rápida (RTS, por sus siglas en Inglés) fabricado por Roche
10 Diagnostics, Inc., pero no está limitado a éste.

Los ejemplos de las células hospederas procarióticas incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Con el fin de transformar las células hospederas con un gen objetivo, las células hospederas son transformadas con un
15 vector plásmido que comprende un replicón, es decir, un origen de replicación derivado de una especie compatible con el hospedero, y una secuencia regulatoria. Además, el vector tiene preferentemente una secuencia capaz de imponer selectividad fenotípica sobre la célula transformada.

20 Los ejemplos de las células hospederas eucarióticas incluyen células de vertebrados, células de insecto, y células de levadura. Respecto a las células de vertebrado, por ejemplo, las células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650; ATCC: American Type
25 Culture Collection), los fibroblastos murinos NIH3T3 (ATCC

No. CRL-1658), y las cepas deficientes en la dihidrofolato-reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) de las células de ovario de hámster Chino (células CHO; ATCC: CCL-61); y similares son
5 frecuentemente utilizadas, sin embargo, las células no están limitadas a éstas.

El transformante obtenido de este modo puede ser cultivado de acuerdo a un método usualmente llevado a cabo en la técnica, y mediante el cultivo del transformante, es
10 producido un polipéptido objetivo intracelularmente o extracelularmente.

Un medio adecuado que va a ser utilizado por el cultivo puede ser seleccionado por aquellos expertos en la técnica a partir de diversos medios de cultivo comúnmente
15 utilizados, dependiendo de las células hospederas empleadas. Si es empleada *Escherichia coli*, por ejemplo, un medio LB suplementado con un antibiótico tal como ampicilina o IPMG como sea necesario puede ser utilizado.

Una proteína recombinante producida
20 intracelularmente o extracelularmente por el transformante a través de tal cultivo, puede ser separada y purificada mediante cualquiera de los diversos métodos de separación conocidos, utilizando la propiedad física o química de la proteína.

25 Los ejemplos específicos de los métodos incluyen el

tratamiento con un precipitante de proteína común, ultrafiltración, diversos tipos de cromatografía líquida tales como la cromatografía de tamices moleculares (filtración en gel), cromatografía de adsorción, 5 cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de afinidad, diálisis, y una combinación de los mismos.

Además, mediante el acoplamiento de un marcador de seis residuos de histidina a una proteína recombinante que va a ser expresada, la proteína puede ser eficientemente 10 purificada con una columna de afinidad de níquel. Alternativamente, mediante el enlace de la región de Fc de IgG a una proteína recombinante que va a ser expresada, la proteína puede ser eficientemente purificada con una columna de proteína A.

15 Por la combinación de los métodos anteriormente descritos, una cantidad grande de un polipéptido objetivo puede ser fácilmente producida con un alto rendimiento y con alta pureza.

El transformante anteriormente descrito mismo puede 20 también ser utilizado como el antígeno. Alternativamente, una línea celular que expresa TROP2 puede ser utilizada como el antígeno. Los ejemplos de tal línea celular pueden incluir las líneas de cáncer pulmonar humano NCI-H322, PC14, NCIH-H2122, y LCAM1, una línea de cáncer de próstata humano 25 PC3, las líneas de cáncer pancreático humano BxPC-3, Capan-1,

y PK-1, una línea de cáncer de ovario humano SKOV3, y una línea de cáncer colorrectal humano COLO205, aunque la línea celular de acuerdo a la presente invención no está limitada a estas líneas celulares siempre y cuando expresen TROP2.

5 (2) Producción de anticuerpo monoclonal anti-TROP2

Los ejemplos del anticuerpo que se enlaza específicamente a TROP2 incluyen un anticuerpo monoclonal que se enlaza específicamente a TROP2, y un método de obtención de tal anticuerpo es como se describe más adelante.

10 La producción de un anticuerpo monoclonal requiere en general los siguientes pasos operacionales de:

(a) purificar un biopolímero que va a ser utilizado como un antígeno, o preparar las células que expresan el antígeno;

15 (b) preparar las células productoras de anticuerpo mediante la inmunización de un animal por inyección del antígeno, recolectar la sangre, evaluar su título de anticuerpo para determinar cuándo es extirpado el bazo;

20 (c) preparar las células de mieloma (de aquí en adelante denominadas como "mieloma");

(d) fusionar las células productoras de anticuerpo con el mieloma;

(e) seleccionar un grupo de hibridomas que producen un anticuerpo deseado;

25 (f) dividir los hibridomas en clones de células simples

(clonación);

(g) opcionalmente, cultivar el hibridoma o criar un animal implantado con el hibridoma para producir una gran cantidad de anticuerpo monoclonal;

- 5 (h) examinar el anticuerpo monoclonal producido de este modo para la actividad biológica y la especificidad de enlace, o evaluar el mismo para las propiedades como un reactivo marcado; y similares.

De aquí en adelante, será descrito con detalle el
10 método de producción de un anticuerpo monoclonal, siguiendo los pasos anteriores, sin embargo, el método no está limitado a los mismos, y, por ejemplo, las células productoras de anticuerpo diferentes de las células del bazo y el mieloma pueden ser utilizadas.

15 (a) Purificación del antígeno

Como el antígeno, TROP2 preparado mediante el método como se describe anteriormente, o un péptido parcial del mismo puede ser utilizado.

Además, una fracción membranal preparada a partir
20 de las células recombinantes que expresan TROP2 o las células recombinantes que expresan TROP2 mismas, y también un péptido parcial de la proteína de la invención químicamente sintetizada por un método conocido por aquellos expertos en la técnica puede ser también utilizada como el antígeno.

25 Además, una línea celular que expresa TROP2 puede

ser también utilizada como el antígeno.

(b) Preparación de las células productoras de anticuerpo

El antígeno obtenido en el paso (a) es mezclado con un adyuvante tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund o agente auxiliar tal como el sulfato de aluminio y potasio, y la mezcla resultante es utilizada como un inmunógeno para inmunizar un animal experimental. En un método alternativo, el animal experimental es inmunizado con células que expresan el antígeno, como un inmunógeno. El animal experimental, cualquier animal utilizado en un método de producción de hibridoma conocido, puede ser utilizado sin impedimentos. Específicamente, por ejemplo, puede ser utilizado un ratón, una rata, una cabra, una oveja, una res, un caballo o similares. No obstante, desde el punto de vista de facilidad de disponibilidad de las células de mieloma que van a ser fusionadas con las células productoras de anticuerpo, extraídas, es preferentemente utilizado un ratón o una rata como el animal que va a ser inmunizado.

Además, la cepa de un ratón o una rata que va a ser utilizada no está particularmente limitada, y en el caso de un ratón, por ejemplo, diversas cepas tales como A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, y 129 y similares pueden ser utilizadas, y en el caso de una rata, por ejemplo, pueden ser utilizadas ratas Wistar, Low, Lewis, Sprague,

Dawley, ACI, BN, Fischer y similares.

Estos ratones y ratas pueden ser obtenidos a partir de criadores/distribuidores de animales experimentales, por ejemplo, CLEA Japan, Inc. y Charles River Laboratories Japan, Inc.

En consideración de compatibilidad de fusión con las células de mieloma descritas más adelante, en el caso de un ratón, la cepa BALB/c, y en el caso de una rata, las cepas Wistar y Low son particularmente preferidas como el animal que va a ser inmunizado.

Además, en consideración de la homología antigénica entre humanos y ratones, se prefiere también utilizar un ratón que tiene función biológica disminuida para remover los auto-anticuerpos, es decir, un ratón con una enfermedad autoinmunitaria.

La edad de tal ratón o rata al tiempo de la inmunización es preferentemente de 5 a 12 semanas de edad, más preferentemente de 6 a 8 semanas de edad.

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

utilizado.

Entre estos métodos de inmunización un método específico preferido en la presente invención es, por ejemplo, como sigue.

5 Es decir, primeramente, una fracción de proteína membranal que sirve como el antígeno o las células promovidas a expresar el antígeno es/son intradérmicamente o intraperitonealmente administradas a un animal. Sin embargo, la combinación de ambas vías de administración es preferida
10 para incrementar la eficiencia de inmunización, y cuando la administración intradérmica es utilizada en la primera mitad y la administración intraperitoneal es realizada en la segunda mitad únicamente a la última dosis, la eficiencia de inmunización puede ser particularmente incrementada.

15 El esquema de administración del antígeno varía dependiendo del tipo de animal que va a ser inmunizado, las diferencias individuales o similares. Sin embargo, en general, un esquema de administración en el cual la frecuencia de administración del antígeno es de 3 a 6 veces y
20 el intervalo de dosificación es de 2 a 6 semanas, es preferido, y es más preferido un esquema de administración en el cual la frecuencia de administración del antígeno es de 3 a 4 veces y el intervalo de dosificación es de 2 a 4 semanas.

Además, la dosis del antígeno varía dependiendo del
25 tipo de animal, las diferencias individuales o similares, sin

embargo, la dosis es en general establecida a 0.05 a 5 mg, preferentemente aproximadamente 0.1 a 0.5 mg.

Una inmunización de refuerzo es realizada 1 a 6 semanas, preferentemente 1 a 4 semanas, más preferentemente 1 a 3 semanas después de la administración del antígeno, como se describió anteriormente. Cuando el inmunógeno es células, son empleadas 1×10^6 a 1×10^7 células.

La dosis del antígeno al tiempo de la realización de la inmunización de refuerzo varía dependiendo del tipo o del tamaño de animal o similar, sin embargo, en el caso de, por ejemplo, un ratón, la dosis es en general ajustada a 0.05 a 5 mg, preferentemente 0.1 a 0.5 mg, más preferentemente aproximadamente 0.1 a 0.2 mg. Cuando el inmunógeno es células, son empleadas 1×10^6 a 1×10^7 células.

Células del bazo o linfocitos que incluyen células productoras de anticuerpo, son asépticamente removidas del animal inmunizado después de 1 a 10 días, preferentemente 2 a 5 días, más preferentemente 2 a 3 días de la inmunización de refuerzo. A este tiempo, el título del anticuerpo es medido, y si un animal que tiene un título de anticuerpo suficientemente incrementado es utilizado, como una fuente de suministro de las células productoras de anticuerpo, el procedimiento subsecuente puede ser llevado a cabo de manera más eficiente.

Los ejemplos del método de medición del título de

anticuerpo que van a ser utilizados aquí, incluyen un método de RIA y un método de ELISA, pero el método no está limitado a éstos. Por ejemplo, si se emplea un método de ELISA, la medición de título del anticuerpo en la invención puede ser
5 llevada a cabo de acuerdo a los procedimientos como se describen más adelante.

Primeramente, un antígeno purificado o parcialmente purificado es adsorbido a la superficie de una fase sólida tal como una placa de 96 pozos para ELISA, y la superficie de
10 la fase sólida que no tiene antígeno adsorbido a la misma, es cubierta con una proteína no relacionada al antígeno tal como albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en Inglés). Después de lavar la superficie, la superficie es puesta en contacto con una muestra serialmente diluida (por ejemplo,
15 suero de ratón) como un anticuerpo primario para permitir que el anticuerpo en la muestra sea de enlace al antígeno.

Además, como un anticuerpo secundario, un anticuerpo marcado con una enzima contra un anticuerpo de ratón es agregado y se deja enlazar al anticuerpo de ratón.
20 Después del lavado, es agregado un sustrato para la enzima y un cambio en la absorbancia que ocurre debido al desarrollo de color inducido por la degradación del sustrato o similar es medido y el título de anticuerpo es calculado con base en la medición.

25 La separación de las células productoras de

anticuerpo de las células del bazo o de los linfocitos del animal inmunizado, puede ser llevado a cabo de acuerdo a un método conocido (por ejemplo, Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977), 6, p. 511; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550; Walsh, Nature (1977), 266, p. 495). Por ejemplo, en el caso de las células del bazo, un método general en el cual las células productoras de anticuerpo son separadas por homogeneización del bazo para obtener las células a través de filtración con una malla de acero inoxidable, y la suspensión de las células en el Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) puede ser empleado.

(c) Preparación de células de mieloma (de aquí en adelante denominada como "mieloma")

Las células de mieloma que van a ser utilizadas para la fusión celular no están particularmente limitadas y las células adecuadas pueden ser seleccionadas de las líneas celulares conocidas. Sin embargo, en consideración de la conveniencia cuando un hibridoma es seleccionado a partir de las células fusionadas, se prefiere utilizar una cepa deficiente en HGPRT (hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa) cuyo procedimiento de selección ha sido establecido.

Más específicamente, los ejemplos de la cepa deficiente en HGPRT incluyen X63-Ag8(X63), NS1-ANS/1(NS1),

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

Estas cepas celulares son subcultivadas en un medio apropiado tal como un medio de 8-azaguanina (un medio obtenido mediante la adición de 8-azaguanina a un medio de RPMI 1640 suplementado con glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina, y suero fetal de ternera (de aquí en adelante denominado como "FBS")), Medio de Dulbecco Modificado de Iscove (IMDM, por sus siglas en Inglés), o el Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en Inglés). En este caso, 3 a 4 días antes de la realización de la fusión celular, las células son subcultivadas en un medio normal (por ejemplo, un medio ASF104 (fabricado por Ajinomoto Co., Ltd.) que contiene 10% de FCS) para asegurar no menos de 2×10^7 células en el día de la fusión celular.

(d) Fusión celular

La fusión entre las células productoras de anticuerpo y las células de mieloma pueden ser apropiadamente realizadas de acuerdo a un método conocido (Weir, D. M. Handbook de Experimental Immunology Vol. I. II. III.,

Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), etc.), bajo condiciones tales que la proporción de supervivencia de las
5 células no es excesivamente reducida.

Como tal, puede ser utilizado un método, por ejemplo, un método químico en el cual las células productoras de anticuerpo y las células de mieloma son mezcladas en una solución que contiene un polímero tal como polietilenglicol a
10 una alta concentración, un método físico utilizando estimulación eléctrica, o similares. Entre estos métodos, un ejemplo específico del método químico es como se describe en seguida.

Es decir, en el caso donde es utilizado el
15 polietilenglicol en la solución que contiene un polímero a una alta concentración, las células productoras de anticuerpo y las células de mieloma son mezcladas en una solución de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 1500 a 6000, más preferentemente 2000 a 4000 a una temperatura de 30 a
20 40°C, preferentemente de 35 a 38°C por 1 a 10 minutos, preferentemente 5 a 8 minutos.

(e) Selección de un grupo de hibridomas

El método de selección de los hibridomas obtenidos mediante la fusión celular anteriormente descrita, no está
25 particularmente limitado. Usualmente, un método de selección

HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) (Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550) es utilizado.

Este método es efectivo cuando los hibridomas son
5 obtenidos utilizando las células de mieloma de una cepa
deficiente en HGPRT que no puede sobrevivir en presencia de
aminopterina. Es decir, mediante el cultivo de las células
no fusionadas y los hibridomas en un medio HAT, únicamente
los hibridomas resistentes a la aminopterina son
10 selectivamente permitidos a sobrevivir y proliferar.

(f) División en el clon de células simples (clonación)

Como un método de clonación para hibridomas, puede
ser utilizado un método conocido tal como un método de
metilcelulosa, un método de agarosa blanda, o un método de
15 dilución limitante (ver, por ejemplo, Barbara, B. M. y
Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W.
H. Freeman y Company, San Francisco (1980)). Entre estos
métodos, particularmente, es preferido un método de cultivo
tridimensional tal como un método de metilcelulosa. Por
20 ejemplo, el grupo de hibridomas producidos por la fusión
celular son suspendidos en un medio de metilcelulosa tal como
el Medio de Selección de ClonaCell-HY D (fabricado por
StemCell Technologies, Inc., #03804) y cultivados.
Posteriormente, son recolectadas las colonias de hibridoma
25 formadas, con lo cual pueden ser obtenidos hibridomas

monoclonales. Las colonias de hibridomas respectivas, recolectadas, son cultivadas, y un hibridoma que ha sido confirmado como poseedor de un título de anticuerpo estable en un sobrenadante de cultivo de hibridoma obtenido, es
5 seleccionado como una cepa de hibridoma productora del anticuerpo monoclonal TROP2.

Los ejemplos de la cepa de hibridoma establecida de este modo, incluyen la cepa de TROP2 TINA1. En esta especificación, un anticuerpo producido por el hibridoma
10 TINA1 de TROP2 es denominado como "anticuerpo TINA1" o simplemente "TINA1".

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

(g) Preparación del anticuerpo monoclonal mediante cultivo de hibridoma

20 Mediante el cultivo del hibridoma seleccionado de este modo, un anticuerpo monoclonal puede ser eficientemente obtenido. Sin embargo, antes del cultivo, se prefiere realizar la selección de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal objetivo.

25 En tal selección, puede ser empleado un método

conocido.

La medición del título del anticuerpo en la invención puede ser llevada a cabo mediante, por ejemplo, un método de ELISA explicado en el inciso (b) descrito
5 anteriormente.

El hibridoma obtenido mediante el método descrito anteriormente puede ser almacenado en un estado congelado en nitrógeno líquido o en un congelador a -80°C o menos.

Después de la terminación de la clonación, el medio
10 es cambiado de un medio HT a un medio normal, y el hibridoma es cultivado.

El cultivo a gran escala es realizado mediante la rotación del cultivo utilizando una botella de cultivo grande o mediante cultivo giratorio. A partir
15 del sobrenadante obtenido por el cultivo a gran escala, un anticuerpo monoclonal que se enlaza específicamente a la proteína de la invención, puede ser obtenido mediante purificación utilizando un método conocido por aquellos expertos en la técnica, tales como la
20 filtración en gel.

Además, el hibridoma es inyectado dentro de la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que el hibridoma (por ejemplo, BALB/c anteriormente descrito) o un ratón Nu/Nu para proliferar el hibridoma, con lo cual el
25 fluido de ascitis que contiene una gran cantidad del

anticuerpo monoclonal de la invención puede ser obtenido.

En el caso donde el hibridoma es administrado en la cavidad abdominal, si un aceite mineral tal como el 2,6,10,14-tetrametil-pentadecano (pristano) es administrado 3 a 7 días antes de éste, puede ser obtenida una gran cantidad de la ascitis.

Por ejemplo, un inmunosupresor es previamente inyectado dentro de la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que el hibridoma para inactivar las células T. 20 días después de esto, 10^6 a 10^7 células del clon de hibridoma son suspendidas en un medio libre de suero (0.5 ml), y la suspensión es administrada en la cavidad abdominal del ratón. En general, cuando el abdomen es expandido y llenado con el fluido de ascitis, el fluido de ascitis es recolectado del ratón. Mediante este método, el anticuerpo monoclonal puede ser obtenido a una concentración que es aproximadamente 100 veces o mucho más alta que aquella en la solución de cultivo.

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

El anticuerpo monoclonal obtenido de este modo tiene alta especificidad de antígeno para TROP2.

(h) Ensayo del anticuerpo monoclonal

El isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal obtenido de este modo pueden ser determinados como sigue.

Primeramente, los ejemplos del método de
5 identificación incluyen un método de Ouchterlony, un método de ELISA, y un método de RIA.

Un método de Ouchterlony es simple, pero cuando la concentración del anticuerpo monoclonal es baja, es requerida una operación de condensación.

10 Por otra parte, cuando un método de ELISA o un método de RIA es utilizado, al hacer reaccionar directamente el sobrenadante de cultivo con una fase sólida adsorbida con antígeno y utilizando anticuerpos que corresponden a diversos tipos de isotipos y subclases de inmunoglobulina, como
15 anticuerpos secundarios, el isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal pueden ser identificados.

Además, como un método más simple, un kit de especificación comercialmente disponible (por ejemplo, el Kit Mouse Typer fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) o
20 similar, puede ser también utilizado.

Además, la determinación cuantitativa de una proteína puede ser realizada por un método de Folin Lowry y un método de cálculo basado en la absorbancia a 280 nm ($1.4 \text{ (OD 280) = Inmunoglobulina 1 mg/ml}$).

25 Además, incluso cuando el anticuerpo monoclonal es

separado e independientemente obtenido mediante la realización nuevamente de los pasos (a) al (h) en (2), es posible obtener un anticuerpo que tiene una actividad citotóxica equivalente a aquella del anticuerpo TINA1. Como un ejemplo de tal anticuerpo, un anticuerpo que se enlaza al mismo epítipo que el anticuerpo TINA1 puede ser ejemplificado. Si un anticuerpo monoclonal recientemente producido se enlaza a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la cual se enlaza el anticuerpo TINA1, se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se enlaza al mismo epítipo que el anticuerpo TINA1. Además, mediante la confirmación de que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo TINA1 por el enlace a TROP2 (es decir, el anticuerpo monoclonal inhibe el enlace entre el anticuerpo TINA1 y TROP2), se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se enlaza al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TROP2, incluso si la secuencia de epítipo específica o la estructura no ha sido determinada. Cuando se confirma que el anticuerpo monoclonal se enlaza al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TROP2, se espera fuertemente que el anticuerpo monoclonal tenga la afinidad de enlace al antígeno y una actividad biológica equivalente a aquella del anticuerpo TINA1.

(3) Otros anticuerpos

El anticuerpo de la invención incluye no solamente

el anticuerpo monoclonal anteriormente descrito contra TROP2, sino también un anticuerpo recombinante obtenido mediante la modificación artificial para el propósito de disminuir la antigenicidad heteróloga a humanos tales como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Estos anticuerpos pueden ser producidos utilizando un método conocido.

Como el anticuerpo quimérico, puede ser ejemplificado un anticuerpo en el cual las regiones variable y constante del anticuerpo son derivadas de diferentes especies, por ejemplo, un anticuerpo quimérico en el cual una región variable de anticuerpo derivada de ratón o de rata es conectada a una región constante de anticuerpo derivada de humano (ver Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)).

Como el anticuerpo humanizado, puede ser ejemplificado un anticuerpo obtenido mediante la integración únicamente de una región de determinación de la complementariedad (CDR) dentro de un anticuerpo derivado de humano (ver Nature (1986) 321, pp. 522-525), y un anticuerpo obtenido mediante el injerto de una parte de los residuos de los aminoácidos de la estructura así como la secuencia CDR a un anticuerpo humano mediante un método de injerto de CDR- (Publicación Internacional No. WO 90/07861).

Sin embargo, el anticuerpo humanizado derivado del

anticuerpo TINA1 no está limitado a un anticuerpo humanizado específico, siempre y cuando el anticuerpo humanizado tenga los 6 tipos de secuencias de CDR del anticuerpo TINA1. La región variable de cadena pesada del anticuerpo TINA1 tiene

5 CDRH1 (TAGMQ) que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 23 en el Listado de Secuencias, CDRH2 (WINTHSGVPKYAEDFKG) que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 24 en el Listado de Secuencias, y CDRH3 (SGFGSSYWYFDV) que consiste

10 de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 25 en el Listado de Secuencias. Además, la región variable de cadena ligera del anticuerpo TINA1 tiene CDRL1 (KASQDVSTAVA) que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 26 en el Listado de

15 Secuencias, CDRL2 (SASYRYT) que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 27 en el Listado de Secuencias, y CDRL3 (QQHYITPLT) que consiste de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 28 en el Listado de Secuencias.

20 Como un ejemplo del anticuerpo humanizado de un ratón anticuerpo TINA1, puede ser ejemplificada una combinación arbitraria de una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de cualquiera de (1) una secuencia de aminoácidos que consiste de los

25 residuos de aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID NO: 12, 14, o

16 en el Listado de Secuencias, (2) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95% o más con la secuencia de aminoácidos (1) descrita anteriormente, y (3) una secuencia de aminoácidos en donde uno o varios de los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (1) descrita anteriormente son suprimidos, sustituidos o agregados en una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de cualquiera de (4) una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 21 a 129 de la SEQ ID NO: 18, 20, o 22 en el Listado de Secuencias, (5) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95% o más con la secuencia de aminoácidos (4) descrita anteriormente, y (6) una secuencia de aminoácidos en donde uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (4) descrita anteriormente están suprimidos, sustituidos o agregados.

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

20 Como la sustitución de aminoácido en esta especificación, es preferida una sustitución conservadora de aminoácido. La sustitución conservadora de aminoácidos se refiere a una sustitución que ocurre dentro de un grupo de aminoácidos relacionados a las cadenas laterales de aminoácido. Los grupos de aminoácidos preferidos son como

25

sigue: un grupo ácido (ácido aspártico y ácido glutámico); un grupo básico (lisina, arginina, e histidina); un grupo no polar (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, y triptofano); y una familia polar no cargada (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, y tirosina). Los grupos de aminoácidos más preferidos son como sigue: un grupo hidroxilo alifático (serina y treonina); un grupo que contiene amida (asparagina y glutamina); un grupo alifático (alanina, valina, leucina, e isoleucina); y un grupo aromático (fenilalanina, triptofano, y tirosina). Tal sustitución de aminoácido es preferentemente realizada dentro de un intervalo que no deteriora las propiedades de una sustancia que tiene la secuencia original de aminoácidos.

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

secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 140 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende una región variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 129 de la SEQ ID NO: 20; un anticuerpo
5 que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 140 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende una región
10 variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 129 de la SEQ ID NO: 22; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 140 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena
15 ligera que comprende una región variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 129 de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región
20 variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 140 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende una región variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 129 de la
25 SEQ ID NO: 20; un anticuerpo que consiste de una cadena

pesada que comprende una región variable que consiste de una
secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de
aminoácidos 20 a la 140 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena
ligera que comprende una región variable que consiste de una
5 secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de
aminoácidos 21 a la 129 de la SEQ ID NO: 22; un anticuerpo
que consiste de una cadena pesada que comprende una región
variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que
consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 140 de la
10 SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que comprende una región
variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que
consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 129 de la
SEQ ID NO: 18; un anticuerpo que consiste de una cadena
pesada que comprende una región variable que consiste de una
15 secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de
aminoácidos 20 a la 140 de la SEQ ID NO: 16 y una cadena
ligera que comprende una región variable que consiste de una
secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de
aminoácidos 21 a la 129 de la SEQ ID NO: 20; y un anticuerpo
20 que consiste de una cadena pesada que comprende una región
variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que
consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 140 de la
SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que comprende una región
variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que
25 consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 129 de la

SEQ ID NO: 22 puede ser ejemplificada.

Además, como un anticuerpo que tiene una combinación más preferida de una cadena pesada y una cadena ligera descrita anteriormente, puede ser ejemplificado un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 470 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 234 de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 470 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 234 de la SEQ ID NO: 20; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 470 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 234 de la SEQ ID NO: 22; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 470 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de

aminoácidos 21 a la 234 de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 470 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena

5 ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 234 de la SEQ ID NO: 20; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 470 de la

10 SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 234 de la SEQ ID NO: 22; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de

15 aminoácidos 20 a la 470 de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 234 de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que

20 consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 470 de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 234 de la SEQ ID NO: 20; y un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una

25 secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de

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

5 Como un anticuerpo que tiene una combinación preferida superior de una cadena pesada y una cadena ligera descrita anteriormente, puede ser ejemplificado un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que
10 consiste de residuos de aminoácidos 20 a la 140 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende una región variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de residuos de aminoácidos 21 a la 129 de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende
15 una región variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de residuos de aminoácidos 20 a la 140 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende una región variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de residuos de aminoácidos 21 a la 129 de la SEQ
20 ID NO: 18; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de residuos de aminoácidos 20 a la 140 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende una región variable que consiste de una
25 secuencia de aminoácidos que consiste de residuos de

aminoácidos 21 a la 129 de la SEQ ID NO: 20; y un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que comprende una región variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de residuos de aminoácidos 20 a la 140 de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que comprende una región variable que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de residuos de aminoácidos 21 a la 129 de la SEQ ID NO: 22.

Además, como un anticuerpo que tiene otra combinación más preferida de una cadena pesada y una cadena ligera descrita anteriormente, puede ser ejemplificado un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ

ID NO: 14 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que
 5 consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo que consiste de una cadena
 10 pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; y un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que
 15 consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

Como un anticuerpo que tiene una combinación preferida superior de una cadena pesada y una cadena ligera descrita anteriormente, puede ser ejemplificado un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que consiste de una
 20 secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 470 de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 234 de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo que consiste de una cadena
 25 pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que

consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 470 de la
 SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que consiste de una
 secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de
 aminoácidos 21 a la 234 de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo
 5 que consiste de una cadena pesada que consiste de una
 secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de
 aminoácidos 20 a la 470 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena
 ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos que
 consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 234 de la
 10 SEQ ID NO: 20; y un anticuerpo que consiste de una cadena
 pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que
 consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a la 470 de la
 SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que consiste de una
 secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de
 15 aminoácidos 21 a la 234 de la SEQ ID NO: 22 puede ser
 ejemplificado.

Además, como un anticuerpo que tiene una
 combinación preferida superior de una cadena pesada y una
 cadena ligera descritas anteriormente, puede ser
 20 ejemplificado un anticuerpo un anticuerpo que consiste de una
 cadena pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos
 que consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a 469 de la
 SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste de una
 secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de
 25 aminoácidos 21 a la 234 de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo

que consiste de una cadena pesada que consiste de una
secuencia de aminoácidos que consiste de las posiciones de
aminoácidos 20 a 469 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera
que consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de
5 las posiciones de aminoácidos 21 a la 234 de la SEQ ID NO:
18; un anticuerpo que consiste de una cadena pesada que
consiste de una secuencia de aminoácidos que consiste de las
posiciones de aminoácidos 20 a 469 de la SEQ ID NO: 14 y una
cadena ligera que consiste de una secuencia de aminoácidos
10 que consiste de las posiciones de aminoácidos 21 a la 234 de
la SEQ ID NO: 20; y un anticuerpo que consiste de una cadena
pesada que consiste de una secuencia de aminoácidos que
consiste de las posiciones de aminoácidos 20 a 469 de la SEQ
ID NO: 16 y una cadena ligera que consiste de una secuencia
15 de aminoácidos que consiste de las posiciones de aminoácidos
21 a la 234 de la SEQ ID NO: 22.

Al combinar una secuencia que tiene un alta
homología con la secuencia de aminoácidos de cadena pesada
anteriormente descrita con una secuencia que tiene una alta
20 homología con la secuencia de aminoácido de cadena ligera
anteriormente descrita, es posible seleccionar un anticuerpo
que tiene una actividad biológica equivalente a aquella de
cada uno de los anticuerpos anteriormente descritos. Tal
homología es en general una homología de 80% o más,
25 preferentemente una homología de 90% o más, más

preferentemente una homología de 95% o más, lo más preferentemente una homología de 99% o más. Además, al combinar una secuencia de aminoácidos en donde uno a varios residuos de aminoácidos están sustituidos, suprimidos o
5 agregados en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada o la cadena ligera, es también posible seleccionar un anticuerpo que tiene una actividad biológica equivalente a aquella de cada uno de los anticuerpos anteriormente descritos.

10 La homología entre dos secuencias de aminoácidos puede ser determinada utilizando los parámetros por omisión del algoritmo Blast versión 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997), "Gapped
15 BLAST and PSI-BLAST: a new generation de proteína database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). El algoritmo Blast puede ser utilizado también a través de la Internet al acceder al sitio www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.

En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada,
20 representada por la SEQ ID NO: 12, 14 o 16 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 1 a al 19 es una secuencia de señal, una secuencia de aminoácidos que consiste de residuos de aminoácidos 20 a la 140 es una región variable, y una
25 secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de

aminoácidos 141 a 470 es una región constante. La secuencia de la SEQ ID NO: 12, 14 y 16 se muestran en las Figuras 3, 4 y 5 respectivamente.

Además, en la secuencia de aminoácidos de cadena ligera, representadas por la SEQ ID NO: 18, 20 o 22 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que consiste de los residuos de aminoácidos 1 al 20 es una secuencia de señal, una secuencia de aminoácidos que consiste de residuos de aminoácidos 21 al 129 es una región variable, y una secuencia de aminoácidos que consiste de residuos de aminoácidos 130 al 234 es una región constante. La secuencia de la SEQ ID NO: 18, 20 y 22 se muestran en las Figuras 6, 7 y 8 respectivamente.

Además, el anticuerpo de la invención incluye un anticuerpo humano que se enlaza a TROP2. Un anticuerpo humano anti-TROP2 se refiere a un anticuerpo humano que tiene únicamente una secuencia de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano. El anticuerpo humano anti-TROP2 puede ser obtenido mediante un método que utiliza un ratón productor de anticuerpo humano, que tiene un fragmento de cromosoma humano que comprende los genes de la cadena pesada y de cadena ligera de un anticuerpo humano (ver Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, pp. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, pp. 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol.

10, pp. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. y Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, pp. 722-727, etc.).

Tal ratón productor de anticuerpo humano puede ser
5 creado específicamente como sigue. Un animal genéticamente modificado en el cual han sido perturbados los locus del gen de la cadena pesada y la cadena ligera de inmunoglobulina endógena humana, y en vez de esto, han sido introducidos locus del gen de la cadena pesada y la cadena ligera de la
10 inmunoglobulina humana, vía un vector cromosómico artificial de levadura (YAC, por sus siglas en Inglés) o similar, es creado al producir un animal y suprimido en algún gen, y un animal transgénico y haciendo copular a estos animales.

Además, de acuerdo a una técnica de ADN
15 recombinante, mediante el uso de los cADNs que codifican cada uno para tal cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo humano, y preferentemente un vector que comprende tales cADNs, las células eucarióticas son transformadas, y una célula transformante que produce un anticuerpo monoclonal
20 humano recombinante es cultivada, con lo cual el anticuerpo puede ser también obtenido a partir del sobrenadante de cultivo.

Aquí, como el hospedero, por ejemplo, pueden ser utilizadas células eucarióticas, preferentemente células de
25 mamífero, tales como células CHO, linfocitos o células de

mieloma.

Además, es también conocido un método para la obtención de un anticuerpo humano derivado de la visualización de fagos, seleccionado de una biblioteca de anticuerpos humanos (ver Wormstone, I. M. et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), pp. 2301-2308; Carmen, S. et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), pp. 189-203; Siriwardena, D. et al., Ophthalmology (2002) 109 (3), pp. 427-431, etc.).

Por ejemplo, puede ser utilizado un método de visualización de fago en el cual una región variable de un anticuerpo humano es expresado sobre la superficie de un fago como un anticuerpo de cadena simple (scFv), y un fago que se enlaza a un antígeno selecciona (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), pp. 1105-1116).

Mediante el análisis del gen del fago seleccionado con base en el enlace a un antígeno, puede ser determinada una secuencia de ADN que codifica para la región variable de un anticuerpo humano, que se enlaza a un antígeno.

Si la secuencia de ADN de scFv que se enlaza a un antígeno es determinada, puede ser obtenido un anticuerpo humano mediante la preparación de un vector de expresión que comprende la secuencia y la introducción del vector dentro de un hospedero apropiado para expresarlo (Publicaciones

Internacionales Nos. WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388; Annu. Rev. Immunol. (1994) 12, pp. 433-455; Nature Biotechnology (2005) 23 (9), pp. 1105-1116).

5 Si un anticuerpo humano recién producido se enlaza a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la cual se enlaza el anticuerpo TINA1, se puede determinar que el anticuerpo humano se enlaza al mismo epítipo que el anticuerpo TINA1. Además, al confirmar que el anticuerpo
10 humano compite con el anticuerpo TINA1 para el enlace a TROP2 (es decir, el anticuerpo humano inhibe el enlace entre el anticuerpo TINA1 y TROP2), se puede determinar que el anticuerpo humano se enlaza al mismo epítipo que el anticuerpo TINA1, incluso si la estructura epítipo o la
15 estructura específica no ha sido determinada. Cuando se confirma que el anticuerpo humano se enlaza al mismo epítipo que el anticuerpo TINA1, se espera fuertemente que el anticuerpo humano tenga una actividad biológica equivalente a aquella del anticuerpo TINA1.

20 Los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanizados, o los anticuerpos humanos obtenidos mediante el método anteriormente descrito, son evaluados para la propiedad de enlace a un antígeno por un método conocido o similar, y puede ser seleccionado un anticuerpo preferido.

25 Como un ejemplo de otro índice más para el uso en

la comparación de las propiedades de los anticuerpos, puede ser ejemplificada la estabilidad de los anticuerpos. La calorimetría de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en Inglés) es un dispositivo capaz de medir rápidamente y de manera exacta una temperatura del punto intermedio de desnaturalización térmica (T_m) para ser utilizada como un índice favorable de la estabilidad conformacional relativa de las proteínas. Al medir los valores de T_m utilizando DSC y comparando los valores, puede ser comparada una diferencia en estabilidad térmica. Se sabe que la estabilidad al almacenamiento de los anticuerpos muestra cierta correlación con la estabilidad térmica de los anticuerpos (Lori Burton, et. al., Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, pp. 265-273), y un anticuerpo preferido puede ser seleccionado mediante el uso de la estabilidad térmica como un índice. Los ejemplos de otros índices para seleccionar anticuerpos incluyen las siguientes características: el rendimiento en una célula hospedera apropiada es alto; y la capacidad de agregación en una solución acuosa es baja. Por ejemplo, un anticuerpo que muestra el más alto rendimiento no siempre muestra la más alta estabilidad térmica, y por lo tanto, es necesario seleccionar un anticuerpo más adecuado para la administración a humanos, mediante la relación de evaluación integral con base en los índices anteriormente descritos.

En la presente invención, es también incluida una variante modificada del anticuerpo. La variante modificada se refiere a una variante obtenida mediante someter el anticuerpo de la presente invención a modificación química o biológica. Los ejemplos de la variante químicamente modificada incluyen variantes químicamente modificadas mediante el enlace de una porción química a un esqueleto de aminoácidos, variantes químicamente modificadas con una cadena de carbohidratos N-enlazada u O-enlazada, etc. Los ejemplos de la variante biológicamente modificada incluyen variantes obtenidas mediante la modificación post-traducciona (tal como la glucosilación N-enlazada u O-enlazada, el procesamiento N- o C-terminal, la desamidación, la isomerización del ácido aspártico, o la oxidación de la metionina), y variantes en las cuales ha sido agregado un residuo de metionina al extremo N, al ser expresado en una célula hospedera procariótica.

Además, un anticuerpo marcado para hacer posible la detección o el aislamiento del anticuerpo o un antígeno de la invención, por ejemplo, un anticuerpo marcado con enzima, un anticuerpo marcado con fluorescencia, y un anticuerpo marcado por afinidad, son también incluidos en el significado de la variante modificada. Tal variante modificada del anticuerpo de la invención es útil para mejorar la estabilidad y la retención sanguínea del anticuerpo, reduciendo la

antigenicidad del mismo, detectando o aislando un anticuerpo o un antígeno, y así sucesivamente.

Además, mediante la regulación de la modificación de un glucano (también llamado glicano) está enlazado al anticuerpo de la invención (glucosilación, defucosilación, etc.), es posible aumentar una actividad citotóxica celular dependiente del anticuerpo. Como la técnica para la regulación de la modificación de un glucano de los anticuerpos, son conocidas las Publicaciones Internacionales Nos. WO 1999/54342, WO 2000/61739, WO 2002/31140, etc. Sin embargo, la técnica no está limitada a éstos. En el anticuerpo de la presente invención, es también incluido un anticuerpo en el cual la modificación de un glucano es regulada.

En el caso donde un anticuerpo es producido primeramente mediante el aislamiento de un gen del anticuerpo y luego introduciendo el gen dentro de un hospedero apropiado, puede ser utilizada una combinación de un hospedero apropiado y un vector de expresión apropiado. Los ejemplos específicos del gen del anticuerpo incluyen una combinación que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo descrito en esta especificación, y un gen que codifica una secuencia de cadena ligera del mismo. Cuando una célula hospedera es transformada, es posible insertar el gen de la secuencia de cadena pesada y el gen de la secuencia

de cadena ligera, dentro del mismo vector de expresión, y también dentro de diferentes vectores de expresión, separadamente.

En el caso donde las células eucarióticas son
5 utilizadas como el hospedero, pueden ser utilizadas células animales, células vegetales, y microorganismos eucarióticos. Como las células animales, pueden ser ejemplificadas las células de mamífero, por ejemplo, células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650),
10 cepas de fibroblastos murinos NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), y cepas deficientes en la dihidrofolato-reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) de las células de ovario de hámster Chino (células CHO; ATCC: CCL-61).

En el caso donde son utilizadas células
15 procarióticas, por ejemplo, pueden ser ejemplificadas *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

Mediante la introducción de un gen de anticuerpo deseado dentro de estas células a través de transformación, y el cultivo de las células transformadas de este modo *in*
20 *vitro*, puede ser obtenido el anticuerpo. En el método de cultivo anteriormente descrito, el rendimiento puede variar algunas veces dependiendo de la secuencia del anticuerpo, y por lo tanto, es posible seleccionar un anticuerpo que es fácilmente producido como un producto farmacéutico mediante
25 el uso del rendimiento como un índice entre los anticuerpos

que tienen una actividad de enlace equivalente. Por lo tanto, en el anticuerpo de la presente invención, es también incluido un anticuerpo obtenido mediante un método de producción de un anticuerpo, caracterizado porque se incluye un paso de cultivo de la célula hospedera transformada y un paso de recolección de un anticuerpo deseado a partir de un producto cultivado, obtenido en el paso de cultivo.

Se sabe que un residuo de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en células de mamífero cultivadas está suprimido (Journal de Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), y se sabe también que dos residuos de aminoácidos (glicina y lisina) en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada, están suprimidos y un residuo de prolina recién localizado en el extremo carboxilo está amidado (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, tal supresión y modificación de la secuencia de la cadena pesada no afecta la afinidad de enlace al antígeno y la función efectora (la activación de un complemento, la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, etc.) del anticuerpo. Por lo tanto, en el anticuerpo de acuerdo a la presente invención, un anticuerpo sometido a tal modificación, y un fragmento funcional del anticuerpo son también incluidos, y una

variante de supresión en la cual uno o dos aminoácidos han sido suprimidos en el extremo carboxilo de la cadena pesada, una variante obtenida por amidación de la variante de supresión (por ejemplo, una cadena pesada en la cual el
5 residuo de prolina carboxilo-terminal ha sido amidado), y similares, son también abarcados. El tipo de variante de supresión que tiene una supresión en el extremo carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo a la invención, no está limitado a las variantes anteriores,
10 siempre y cuando la afinidad de enlace al antígeno y la función efectora sean conservadas. Las dos cadenas pesadas que constituyen el anticuerpo de acuerdo a la invención pueden ser de un tipo seleccionado del grupo que consiste de una cadena pesada de longitud completa y una variante de
15 supresión anteriormente descrita, o puede ser de dos tipos en combinación seleccionados de la misma. La proporción de la cantidad de cada variante de supresión puede ser afectada por el tipo de células de mamífero cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo a la invención, y las
20 condicione de cultivo, sin embargo, puede ser ejemplificado un caso donde un residuo de aminoácido en el extremo carboxilo ha sido suprimido en las dos cadenas pesadas contenidas como componentes principales en el anticuerpo de acuerdo a la invención.

25 Como isotipo del anticuerpo de la invención, por

ejemplo, puede ser ejemplificado IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), y pueden ser ejemplificados IgG1 o IgG2.

Como la actividad biológica del anticuerpo, en general una actividad de enlace al antígeno, puede ser ejemplificada una actividad de internalización en las células que expresan un antígeno, mediante el enlace al antígeno, una actividad de neutralización de la actividad de un antígeno, una actividad de mejoramiento de la actividad de un antígeno, una actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC, por sus siglas en Inglés), una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en Inglés), y una actividad de fagocitosis mediada por células, dependiente del anticuerpo (ADCP, por sus siglas en Inglés). La función del anticuerpo de la presente invención es una actividad de enlace a TROP2, preferentemente una actividad de internalización en las células que expresan TROP2, mediante el enlace a TROP2. Además, el anticuerpo de la presente invención puede tener una actividad de ADCC, una actividad de CDC, y/o una actividad de ADCP además de una actividad de internalización celular.

El anticuerpo obtenido puede ser purificado hasta la homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo puede ser utilizada empleando un método convencional de separación y purificación de proteínas.

Por ejemplo, el anticuerpo puede ser separado y purificado al seleccionar y combinar apropiadamente la cromatografía en columna, filtración con filtro, ultrafiltración, precipitación salina, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida preparativa, electroforesis de enfoque isoelectrico, y similares (Strategies for Protein Purification y Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero el método no está limitado a éstos.

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

Tal cromatografía puede ser realizada empleando cromatografía líquida tal como HPLC o FPLC.

Como una columna que va a ser utilizada en la cromatografía de afinidad, puede ser ejemplificada una columna de Proteína A y una columna de Proteína G. Por ejemplo, como una columna que utiliza una columna de Proteína A, pueden ser ejemplificadas Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia) y similares.

Además, mediante el uso de un portador que tiene

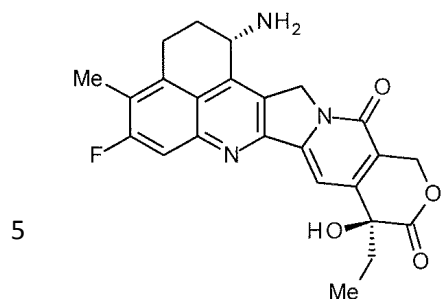
un antígeno inmovilizado sobre el mismo, el anticuerpo puede ser también purificado utilizando la propiedad de enlace del anticuerpo al antígeno.

Compuesto antitumoral

5 El compuesto antitumoral que va a ser conjugado al conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención, es aplicado. El compuesto antitumoral utilizado en la presente invención no está particularmente limitado si éste es un compuesto que tiene un efecto antitumoral y
10 un grupo sustituyente, o una estructura parcial que permite la conexión a una estructura ligadora. Cuando una parte o todo el ligador es escindido en las células tumorales, la porción del compuesto antitumoral es liberada para mostrar el efecto antitumoral del compuesto antitumoral. A medida
15 que el ligador es escindido en una posición de conexión al fármaco, el compuesto antitumoral es liberado en su estructura no modificada para exhibir su efecto antitumoral intrínseco.

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

Fórmula 14



Aunque tiene un efecto antitumoral excelente, el exatecán no ha sido comercializado como un fármaco antitumoral. El compuesto puede ser fácilmente obtenido mediante un método conocido y el grupo amino en la posición 1 puede ser preferentemente utilizado como una posición de conexión a la estructura ligadora. Además, aunque el exatecán puede también ser liberado en las células tumorales mientras que parte del ligador está todavía enlazado a las mismas, éste es un compuesto excelente que muestra un efecto antitumoral excelente incluso en tal estructura.

10

15

Debido a que el exatecán tiene una estructura de camptotecina, se sabe que el equilibrio se desplaza hacia una estructura con un anillo de lactonas cerrado (anillo cerrado) en un medio ácido acuoso (por ejemplo, pH 3 o similar) pero éste cambia a una estructura con un anillo de lactona abierto (anillo abierto) en un medio básico acuoso (por ejemplo, pH 10 o similar). Un conjugado de fármaco que es introducido con un residuo de exatecán que corresponde a la estructura de anillo cerrado y la estructura de anillo abierto, se espera

20

25

también que tenga el mismo efecto antitumoral y no es necesario decir que cualquiera de esos estados están dentro del alcance de la presente invención.

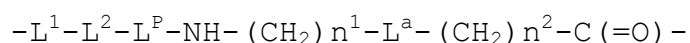
Otros ejemplos del compuesto antitumoral pueden
5 incluir la doxorubicina, daunorrubicina, mitomicina C, bleomicina, ciclocitidina, vincristina, vinblastina, metotrexato, agente antitumoral basado en platino (cisplatina o derivados del mismo), taxol o derivados del mismo, y camptotecina o derivados del mismo (el agente antitumoral
10 descrito en la Patente Japonesa Abierta al Público No. 6-87746).

Con respecto al conjugado anticuerpo-fármaco, el número de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo, es un factor clave que tiene una influencia sobre la eficacia y la seguridad. La producción del conjugado
15 anticuerpo-fármaco es realizada al definir la condición de reacción que incluye las cantidades de uso de las materias primas y los reactivos para reaccionar, para tener así un número constante de moléculas farmacológicas conjugadas, y el conjugado anticuerpo-fármaco es en general obtenido como una
20 mezcla que contiene diferentes números de moléculas de fármaco conjugadas, de manera contraria a la reacción química de un compuesto de bajo peso molecular. El número de los fármacos conjugado en una molécula de anticuerpo es expresado o especificado por el valor promedio, es decir, el número
25 promedio de moléculas de fármaco conjugadas. A no ser que se

describa específicamente de otro modo como un principio, el número de moléculas de fármaco conjugadas significa un valor promedio excepto en un caso en el cual éste representa un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene un número específico de moléculas de fármaco conjugadas que está incluido en una mezcla del conjugado anticuerpo-fármaco que tiene un número diferente de moléculas de fármaco conjugadas. El número de moléculas de exatecán conjugadas a una molécula de anticuerpo es controlable, y como un número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por anticuerpo, pueden ser conectados aproximadamente 1 a 10 exatecanos. Preferentemente, éste es de 2 a 8, y más preferentemente de 3 a 8. Mientras tanto, una persona experta en la técnica puede diseñar una reacción para la conjugación de un número requerido de moléculas de fármaco a una molécula de anticuerpo, con base en la descripción de los Ejemplos de la presente solicitud, y puede obtener un conjugado anticuerpo-fármaco con un número controlado de moléculas de exatecán.

Estructura del ligador

Con respecto al conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención, la estructura ligadora para conjugar un compuesto antitumoral al anticuerpo anti-TROP2 es explicada. El ligador tiene una estructura de la siguiente fórmula:



El anticuerpo está conectado al extremo terminal de

L^1 (extremo opuesto a la conexión a L^2), y el compuesto antitumoral está conectado al grupo carbonilo de la porción - $L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$.

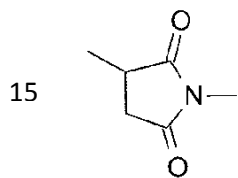
n^1 representa un número entero de 0 a 6 y es
5 preferentemente un número entero de 1 a 5, y más preferentemente 1 a 3.

1. L^1

L^1 es representado por la estructura de
- (Succinimid-3-il-N) - $(CH_2)n^3-C(=O)-$.

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

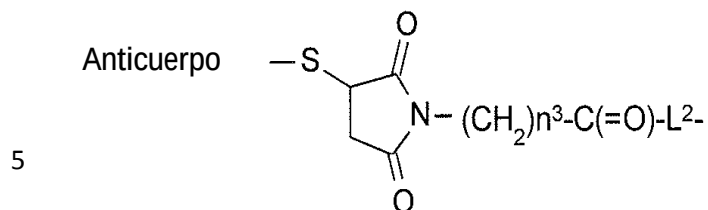
Fórmula 15



La posición 3 de la estructura parcial anterior es una posición de conexión al anticuerpo anti-TROP2. El enlace al anticuerpo anti-TROP2 en la posición 3 está caracterizado
20 por el enlace en la formación de tioéter. El átomo de nitrógeno en la posición 1 de la porción estructural está conectado al átomo de carbono del metileno el cual está presente dentro del ligador incluyendo la estructura. Específicamente, - (Succinimid-3-il-N) - $(CH_2)n^3-C(=O)-L^2-$ es una
25 estructura representada por la siguiente fórmula (en la

presente, "anticuerpo-S-" que origina de un anticuerpo).

Fórmula 16



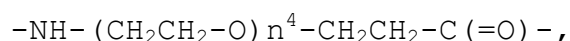
En la fórmula, n^3 es un número entero de 2 a 8, y preferentemente 2 a 5.

Los ejemplos específicos de L^1 pueden incluir

- 10 - (Succinimid-3-il-N) - CH_2CH_2 - C(=O) -,
 - (Succinimid-3-il-N) - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ - C(=O) -,
 - (Succinimid-3-il-N) - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ - C(=O) -,
 - (Succinimid-3-il-N) - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ - C(=O) -.

2. L^2

15 L^2 es un ligador representado por la siguiente estructura:



20 L^2 puede no estar presente, y en tal caso, L^2 es un enlace sencillo. En lo anterior, n^4 es un número entero de 1 a 6, y preferentemente 2 a 4. L^2 está conectado a L^1 en su grupo amino terminal y está conectado a L^p en su grupo carbonilo en el otro extremo.

Ejemplos específicos de L^2 pueden incluir

- NH- CH_2CH_2 -O- CH_2CH_2 -C(=O) -,
 25 -NH- CH_2CH_2 -O- CH_2CH_2 -O- CH_2CH_2 -C(=O) -,

-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-,

-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-,

-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-,

-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-

5 C(=O)-.

3. L^P

L^P es un residuo peptídico que consiste de 2 a 7 aminoácidos. Específicamente, éste consiste de un residuo oligopeptídico en el cual 2 a 7 aminoácidos está enlazados
10 por un enlace peptídico. L^P está conectado a L² en su extremo N y está conectado al grupo amino de la porción -NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-(CH₂)^{n²}-C(=O)- del ligador en su extremo C.

El aminoácido constituye L^P en el ligador no está particularmente limitado, sin embargo los ejemplos del mismo
15 incluyen un L- o un D-aminoácido, preferentemente un L-aminoácido. Y, éste puede ser un aminoácido que tiene una estructura tal como β-alanina, ácido ε-aminocaproico, o ácido γ-aminobutírico además de un α-aminoácido, además, éste puede ser un aminoácido del tipo no natural tal como el aminoácido
20 N-metilado.

La secuencia de aminoácidos de L^P no está particularmente limitada, pero los ejemplos del aminoácido constituyente incluyen fenilalanina (Phe; F), tirosina (Tyr; Y), leucina (Leu; L), glicina (Gly; G), alanina (Ala; A),
25 valina (Val; V), lisina (Lys; K), citrulina (Cit), serina

(Ser; S), ácido glutámico (Glu; E), y ácido aspártico (Asp; D).

Entre ellos, los ejemplos preferidos incluyen fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico, y ácido aspártico. Dependiendo del tipo del aminoácido, el patrón de liberación del fármaco puede ser controlado. El número del aminoácido puede estar entre 2 a 7.

Los ejemplos específicos de L^P pueden incluir

-GGF-,
 -DGGF-,
 10 - (D-) D-GGF-,
 -EGGF-,
 -GGFG-,
 -SGGF-,
 -KGGF-,
 15 -DGGFG-,
 -GGFGG-,
 -DDGGFG-,
 -KDGGFG-,
 -GGFGGGF-.

20 En lo anterior, "(D-)D" representa un Ácido D-aspártico. Los ejemplos particularmente preferidos de L^P para el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención pueden incluir un residuo tetrapeptídico de -GGFG-.

4. $L^a - (CH_2)_n - C(=O) -$

25 L^a en $L^a - (CH_2)_n - C(=O) -$ es una estructura de -O- o

un enlace sencillo. n^2 es un número entero de 0 a 5, más preferentemente 0 a 3, más preferentemente 0 o 1.

Los ejemplos de $L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ pueden incluir aquellos que tienen las siguientes estructuras:

- 5 $-O-CH_2-C(=O)-$,
 $-O-CH_2CH_2-C(=O)-$,
 $-O-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,
 $-O-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,
 $-O-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,
10 $-CH_2-C(=O)-$,
 $-CH_2CH_2-C(=O)-$,
 $-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,
 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,
 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$.
15 De ellos,
 $-O-CH_2-C(=O)-$,
 $-O-CH_2CH_2-C(=O)-$, o

un caso en el cual L^a es un enlace sencillo, y n^2 es 0 es preferido.

- 20 Los ejemplos específicos de la estructura representada por $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ en el ligador pueden incluir
 $-NH-CH_2-C(=O)-$,
 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$,
25 $-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$,

-NH-CH₂CH₂-O-C(=O)-,

-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

5 -NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-, o

-NH-CH₂CH₂-O-C(=O)-

es más preferida.

10 En el ligador, la longitud de cadena de -NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-(CH₂)^{n²}-C(=O)- es preferentemente una longitud de cadena de 4 a 7 átomos, y más preferentemente una longitud de cadena de 5 o 6 átomos.

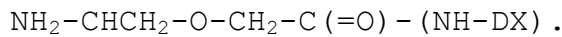
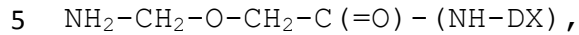
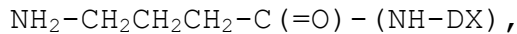
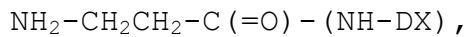
Con respecto al conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención, se considera que cuando el

15 conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco es transferido a la parte interna de las células tumorales, la porción ligadora es escindida y el derivado del fármaco que tiene una estructura representada por NH₂-(CH₂)^{n¹}-L^a-(CH₂)^{n²}-C(=O)-(NH-

20 DX) es liberada para expresar una acción antitumoral. Los ejemplos del derivado antitumoral que muestran un efecto antitumoral por la liberación desde el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención, incluyen un derivado antitumoral que tiene una porción estructural en la cual la

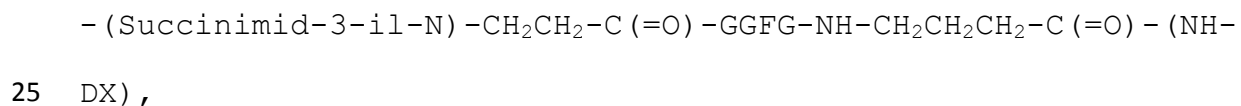
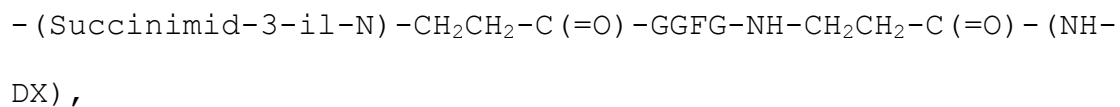
25 estructura representada por -NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-(CH₂)^{n²}-C(=O)- del

ligador, tiene un grupo amino terminal, y los que son particularmente preferidos incluyen los siguientes.



Mientras tanto, en el caso de $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O) - (NH-DX)}$, se confirmó que, ya que la estructura de amina en la molécula es inestable, ésta nuevamente sufre una
 10 autodegradación para liberar lo siguiente $\text{HO-CH}_2\text{-C(=O) - (NH-DX)}$. Esos compuestos pueden ser también preferentemente utilizados como un intermediario de producción del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención.

Para el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente
 15 invención en el cual el exatecán es utilizado como un fármaco, es preferible que la porción estructural de fármaco-ligador $[-\text{L}^1\text{-L}^2\text{-L}^p\text{-NH-(CH}_2\text{)}^{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2\text{)}^{n^2}\text{-C(=O) - (NH-DX)]$ que tiene la siguiente estructura, está conectado a un anticuerpo. El número conjugado promedio de la porción
 20 estructural fármaco-ligador por anticuerpo, puede ser 1 a 10. Preferentemente, ésta es 2 a 8, y más preferentemente 3 a 8.



- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-
C(=O) - (NH-DX) ,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
C(=O) - (NH-DX) ,
- 5 - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-
C(=O) - (NH-DX) ,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
10 C(=O) - (NH-DX) ,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-
C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-
C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- 15 - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) .

Entre ellos, los más preferidos son los siguientes.

- 20 - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-
DX) ,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
C(=O) - (NH-DX) ,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-
25 C(=O) - (NH-DX) ,

- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O) - (NH-DX) ,

- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-
C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,

5 - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) .

Los que son particularmente preferidos son los
siguientes.

- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-
10 C(=O) - (NH-DX) ,

- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O) - (NH-DX) ,

- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-
C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) .

15 Con respecto a la estructura ligadora para la
conjugación del anticuerpo anti-TROP2 y un fármaco en el
conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención, el
ligador preferido puede ser construido mediante la conexión
de las estructuras preferidas mostradas para cada parte del
20 ligador explicado anteriormente. Como para la estructura
ligadora, aquellos con la siguiente estructura pueden ser
preferentemente utilizados. Mientras tanto, el extremo
izquierdo de la estructura es una posición de conexión con el
anticuerpo y el extremo derecho es una posición de conexión
25 con el fármaco.

- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) -,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) -,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) -,
- 5 - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) -,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O) -,
- 10 - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O) -,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) -,
- 15 - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) -,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) -,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) -.
- 20

Entre ellos, los más preferidos son los siguientes.

- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) -,
- (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) -,
- 25 - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-

C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-

C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-

5 C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

Los que son particularmente preferidos incluyen los siguientes.

10 -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-

15 C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

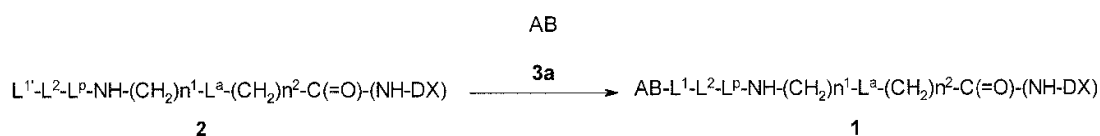
Método de producción

En seguida, se dan las explicaciones para el método representativo para la producción del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención, o un intermediario de producción del mismo. Mientras tanto, los compuestos son descritos en seguida con el número del compuesto mostrado en cada fórmula de reacción. Específicamente, éstos son denominados como un "compuesto de la fórmula (1)", un "compuesto (1)", o similar. Los compuestos con números diferentes de esos son también descritos similarmente.

1. Método de producción 1

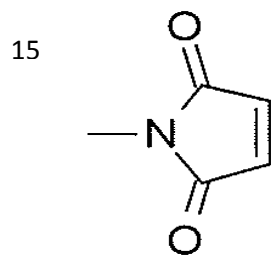
El conjugado anticuerpo-fármaco representado por la fórmula (1) que está conectada a la estructura de fármaco-ligador vía un enlace tioéter puede ser producido mediante el siguiente método, por ejemplo.

Fórmula 17



[En la fórmula, AB representa un anticuerpo que tiene un grupo sulfhidrilo, y L^{1'} representa L¹ la estructura del ligador en la cual el extremo ligador es un grupo maleimidilo (fórmula mostrada en seguida)

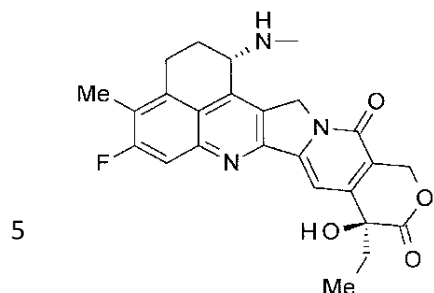
Fórmula 18



(en la fórmula, el átomo de nitrógeno es la posición de conexión),

y específicamente representa un grupo en el cual la porción -(Succinimid-3-il-N)- en -(Succinimid-3-il-N)-(CH₂)ⁿ-C(=O)- de L¹ es un grupo maleimidilo. Además, la porción -(NH-DX) representa una estructura representada por la siguiente fórmula:

Fórmula 19



y ésta representa un grupo que es derivado por la eliminación de un átomo de hidrógeno del grupo amino en la posición 1 de exatecán.]

10 Además, el compuesto de la fórmula (1) en la fórmula de reacción anterior es interpretado como una estructura en la cual una porción estructural correspondiente del fármaco hacia el extremo ligador, se conecta a un anticuerpo. Sin embargo, es únicamente la descripción dada
15 para fines de conveniencia, y existen efectivamente muchos casos en los cuales una pluralidad de las porciones estructurales están conectadas a una molécula de anticuerpo. Lo mismo aplica a la explicación del método de producción descritas más adelante.

20 El conjugado anticuerpo-fármaco (1) puede ser producido mediante la reacción del compuesto (2), el cual es obtenible mediante el método descrito más adelante, con el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo.

El anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo
25 puede ser obtenido mediante un método bien conocido en la

técnica (Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)). Los ejemplos incluyen: el reactivo de Traut se hace reaccionar con el grupo amino del anticuerpo; los S-acetiltioalcanoatos de N-succinimidilo se hacen reaccionar con el grupo amino del anticuerpo, seguido por la reacción con la hidroxilamina; después de la reacción con el 3-(piridilditio)propionato de N-succinimidilo, el anticuerpo se hace reaccionar con un agente reductor; el anticuerpo se hace reaccionar con un agente reductor tal como ditiotreitól, 2-mercaptoetanol, y clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, por sus siglas en Inglés) para reducir el enlace disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo, para formar un grupo sulfhidrilo, pero no está limitado a éste.

15 Específicamente, utilizando 0.3 a 3 equivalentes molares de TCEP como un agente reductor por disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo, y haciéndolo reaccionar con el anticuerpo en una solución amortiguadora que contiene un agente quelante, el anticuerpo con el enlace disulfuro parcial o completamente reducido en la parte de bisagra en el anticuerpo, puede ser obtenido. Los ejemplos del agente quelante incluyen el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Éste puede ser utilizado a una concentración de 1 mM a 20 mM. Los ejemplos de la solución amortiguadora que puede ser utilizada incluyen

una solución de fosfato de sodio, borato de sodio o acetato de sodio. Específicamente, mediante la reacción del anticuerpo con TCEP a 4°C a 37°C por 1 a 4 horas, el anticuerpo (3a) que tiene el grupo sulfhidrilo parcial o
5 completamente reducido, puede ser obtenido.

Mientras tanto, al conducir la reacción para la adición de un grupo sulfhidrilo a una porción de fármaco-ligador, la porción de fármaco-ligador puede ser conjugada por un enlace tioéter.

10 Utilizando 2 a 20 equivalentes molares del compuesto (2) por el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo, el conjugado anticuerpo-fármaco (1) en el cual 2 a 8 moléculas de fármaco son conjugadas por anticuerpo, puede ser producido. Específicamente, es suficiente que la solución
15 que contiene el compuesto (2) disuelta en éste sea agregada a una solución amortiguadora que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo para la reacción. En la presente, los ejemplos de la solución amortiguadora que puedan ser utilizados incluyen solución de acetato de sodio, fosfato de sodio, y borato de sodio. El pH para la reacción
20 es de 5 a 9, y más preferentemente la reacción es realizada cerca de pH 7. Los ejemplos del solvente para la disolución del compuesto (2) incluyen un solvente orgánico tal como sulfóxido de dimetilo (DMSO), dimetilformamida (DMF),
25 dimetilacetamida (DMA), y N-metil-2-piridona (NMP).

Es suficiente que la solución del solvente orgánico que contiene el compuesto (2) disuelto en ésta sea agregado a 1 a 20% v/v a una solución amortiguadora que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo para la
5 reacción. La temperatura de reacción es 0 a 37°C, más preferentemente 10 a 25°C, y el tiempo de reacción es de 0.5 a 2 horas. La reacción puede ser determinada por la desactivación de la reactividad del compuesto sin reaccionar (2) con un reactivo que contiene tiol. Los ejemplos del
10 reactivo que contiene tiol incluyen cisteína y N-acetil-L-cisteína (NAC). Más específicamente, 1 a 2 equivalentes molares de NAC son agregados al compuesto (2) utilizado y, por la incubación a temperatura ambiente por 10 a 30 minutos, la reacción puede ser terminada.

15 El conjugado anticuerpo-fármaco (1) producido puede ser sometido a, después de la concentración, intercambio de amortiguador, purificación, y medición de la concentración del anticuerpo y el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo, de acuerdo a los
20 procedimientos comunes descritos en seguida, la identificación del conjugado anticuerpo-fármaco (1).

Procedimiento común A: Concentración de la solución acuosa del anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco

25 A un recipiente Amicon Ultra (50,000 MWCO,

Millipore Corporation), se agregó una solución del anticuerpo o del conjugado anticuerpo-fármaco, y la solución del anticuerpo o del conjugado anticuerpo-fármaco fue concentrada por centrifugación (centrifugación por 5 a 20 minutos a 2000 G a 3800 G) utilizando una centrífuga (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.).

Procedimiento común B: Medición de la concentración del anticuerpo

Utilizando un detector de UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), la medición de la concentración del anticuerpo fue llevada a cabo de acuerdo al método definido por el fabricante. A ese tiempo, se utilizó un coeficiente de absorción de 280 nm diferente para cada anticuerpo ($1.3 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ hasta $1.8 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

15 Procedimiento común C-1: Intercambio de Amortiguador para el anticuerpo

Una columna NAP-25 (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) utilizando el portador Sephadex G-25 fue equilibrado con el amortiguador de fosfato (10 mM, pH 6.0; ésta se refiere a PBS6.0/EDTA en la especificación) que contenía cloruro de sodio (137 mM) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 5 mM) de acuerdo al método definido por el fabricante. La solución acuosa del anticuerpo fue aplicada en una cantidad de 2.5 ml a la columna simple de NAP-25, y luego la fracción (3.5 ml) eluida

con 3.5 ml de PBS6.0/EDTA fue recolectada. La fracción resultante fue concentrada mediante el Procedimiento común A. Después de la medición de la concentración del anticuerpo utilizando el Procedimiento común B, la concentración del anticuerpo fue ajustada a 10 mg/ml utilizando PBS6.0/EDTA.

Procedimiento común C-2: Intercambio de Amortiguador para el anticuerpo

La columna NAP-25 (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) utilizando el portador Sephadex G-25 fue equilibrada con el amortiguador de fosfato (50 mM, pH 6.5; ésta es denominada como PBS6.5/EDTA en la especificación) que contenía cloruro de sodio (50 mM) y EDTA (2 mM) de acuerdo al método definido por el fabricante. La solución acuosa del anticuerpo fue aplicada en una cantidad de 2.5 ml a la columna simple de NAP-25, y luego fue recolectada la fracción (3.5 ml) eluida con 3.5 ml de PBS6.5/EDTA. La fracción resultante fue concentrada mediante el Procedimiento común A. Después de la medición de la concentración del anticuerpo utilizando el Procedimiento común B, la concentración del anticuerpo fue ajustada a 20 mg/ml utilizando PBS6.5/EDTA.

Procedimiento común D: Purificación del conjugado anticuerpo-fármaco

La columna NAP-25 fue equilibrada con cualquier amortiguador seleccionado del amortiguador de fosfato

comercialmente disponible (PBS7.4, Cat. No. 10010-023, Invitrogen), amortiguador de fosfato de sodio (10 mM, pH 6.0; éste es denominado como PBS6.0) que contenía cloruro de sodio (137 mM), y amortiguador de acetato que contenía sorbitol (5%) (10 mM, pH 5.5; éste es denominado como ABS en la especificación). La solución acuosa de la reacción del conjugado anticuerpo-fármaco fue aplicada en una cantidad de aproximadamente 1.5 ml en la columna NAP-25, y luego se eluyó con el amortiguador en una cantidad definida por el fabricante para recolectar la fracción del anticuerpo. La fracción recolectada fue nuevamente aplicada a la columna NAP-25 y, por repetición 2 a 3 veces en total del proceso de purificación por filtración en gel para la elución con el amortiguador, el conjugado anticuerpo-fármaco excluyendo el ligador no conjugado al fármaco y un compuesto de bajo peso molecular (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), N-acetil-L-cisteína (NAC), y sulfóxido de dimetilo) fue obtenido.

Procedimiento común E: Medición de la concentración del anticuerpo en el conjugado anticuerpo-fármaco y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo (1).

La concentración del fármaco conjugado en el conjugado anticuerpo-fármaco puede ser calculada mediante la medición de la absorbancia de UV de una la solución acuosa

del conjugado anticuerpo-fármaco a dos longitudes de onda de 280 nm y 370 nm, seguido por la realización del cálculo mostrado más adelante.

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

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

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

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

coeficiente de absorción molar de un precursor de conjugado a 280 nm, $\epsilon_{D,370}$ representa el coeficiente de absorción molar de un precursor de conjugado a 370 nm, C_A representa la concentración del anticuerpo en un conjugado anticuerpo-fármaco, y C_D representa la concentración del fármaco en un conjugado anticuerpo-fármaco.

Como para $\epsilon_{A,280}$, $\epsilon_{A,370}$, $\epsilon_{D,280}$, y $\epsilon_{D,370}$ en lo anterior, son utilizados los valores previamente preparados (valor estimado basado en el cálculo o en el valor de medición obtenido por la medición de UV del compuesto). Por ejemplo, $\epsilon_{A,280}$ puede ser estimado a partir de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo utilizando un método de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). $\epsilon_{A,370}$ es en general cero. $\epsilon_{D,280}$ y $\epsilon_{D,370}$ pueden ser obtenidos con base en la ley de Lambert-Beer (Absorbancia = concentración molar x coeficiente de absorción molar x longitud de trayectoria de la célula) mediante la medición de la absorbancia de una solución en la cual el precursor del conjugado que va a ser utilizado es disuelto a una cierta concentración molar. Por la medición A_{280} y A_{370} de una solución acuosa del conjugado anticuerpo-fármaco y resolviendo las ecuaciones simultáneas (I) y (II) utilizando los valores, C_A y C_D pueden ser obtenidos. Además, al dividir C_D entre C_A , el número promedio de fármaco conjugado por anticuerpo, puede ser obtenido.

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

El número promedio de moléculas del fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo en el conjugado anticuerpo-fármaco puede ser también determinada mediante el análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un método descrito más adelante, además del Procedimiento común E anteriormente mencionado.

10 F-1. Preparación de la muestra para el análisis de HPLC (reducción de conjugado anticuerpo-fármaco)

Una solución del conjugado anticuerpo-fármaco (aproximadamente 1 mg/ml, 60 μ l) es mezclada con una solución acuosa de ditioneitol (DTT) (100 mM, 15 μ l). La mezcla es incubada a 37°C por 30 minutos para romper el enlace disulfuro entre la cadena L y la cadena H del conjugado anticuerpo-fármaco. La muestra resultante es utilizada en el análisis de HPLC

F-2. Análisis de HPLC

20 El análisis de HPLC es conducido bajo las siguientes condiciones de medición:

Sistema de HPLC: Sistema de HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies, Inc.).

Detector: espectrómetro de absorción de UV
25 (longitud de onda de medición: 280 nm).

Columna: PLRP-S (2.1 × 50 mm, 8 μm, 1000 angstroms; Agilent Technologies, Inc., P/N PL1912-1802).

Temperatura de la columna: 80°C.

Fase móvil A: solución acuosa al 0.04% de ácido trifluoroacético (TFA).

Fase móvil B: solución de acetonitrilo que contiene 0.04% TFA.

Programa del gradiente: 29%-36% (0 min-12.5 min), 36%-42% (12.5-15 min), 42%-29% (15 min-15.1 min), 29%-29% (15.1 min-25 min).

Volumen de inyección de la muestra: 15 μl.

F-3. Análisis de datos

F-3-1 comparado con una cadena L (L_0) y una cadena H (H_0) de un anticuerpo no conjugado, una cadena L conjugada al fármaco (cadena L conectada a una molécula del fármaco: L_1) y cadenas H (cadena H conectada a una molécula del fármaco: H_1 , cadena H conectadas a dos moléculas del fármaco: H_2 , cadena H conectada a tres moléculas de fármaco: H_3) muestra más alta hidrofobicidad en proporción al número de las moléculas de fármaco conjugadas, y de este modo tienen un tiempo de retención más prolongado. Estas cadenas son por lo tanto eluidas en el orden de L_0 y L_1 o H_0 , H_1 , H_2 , y H_3 . Los picos de detección pueden ser asignados a cualquiera de L_0 , L_1 , H_0 , H_1 , H_2 , y H_3 por la comparación de los tiempos de

retención con L_0 y H_0 .

F-3-2 Ya que el ligador de fármaco tiene absorción de UV, los valores del área del pico son corregidos en respuesta al número de moléculas conjugadas del ligador de fármaco de acuerdo a la siguiente expresión, utilizando los coeficientes de absorción molar de la cadena L, la cadena H, y el ligador de fármaco.

Expresión 1

$$\begin{aligned}
 & \text{Valor corregido del área del pico de la cadena L } (L_i) \\
 &= \frac{\text{Área del pico}}{\text{Coeficiente de extinción molar de la cadena L} + \frac{\text{Coeficiente de extinción molar de la cadena L} \times \text{El número de moléculas de fármaco conjugadas} \times \text{Coeficiente de extinción molar del ligador del fármaco}}{\text{Coeficiente de extinción molar del ligador del fármaco}}}
 \end{aligned}$$

Expresión 2

$$\begin{aligned}
 & \text{Valor corregido del área del pico de la cadena H } (H_i) \\
 &= \frac{\text{Área del pico}}{\text{Coeficiente de extinción molar de la cadena H} + \frac{\text{Coeficiente de extinción molar de la cadena H} \times \text{El número de moléculas del fármaco conjugadas} \times \text{Coeficiente de extinción molar del ligador del fármaco}}{\text{Coeficiente de extinción molar del ligador del fármaco}}}
 \end{aligned}$$

Aquí, como para el coeficiente de extinción molar (280 nm) de la cadena L o la cadena H de cada anticuerpo, puede ser utilizado un valor estimado a partir de la secuencia de aminoácidos de la cadena L o la cadena H de cada anticuerpo por un método de cálculo conocido (Protein

Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). En el caso de hTINA, un coeficiente de extinción molar de 34690 y un coeficiente de extinción molar de 95000 fueron utilizados como los valores estimados para la cadena L y la cadena H, respectivamente, de acuerdo a su secuencia de aminoácidos. Como para el coeficiente de extinción molar (280 nm) del ligador de fármaco, el coeficiente de extinción molar medido (280 nm) de un compuesto en el cual el grupo maleimida fue convertido al tioéter de succinimida por la reacción de cada ligador de fármaco con mercaptoetanol o N-acetilcisteína, fue utilizado.

F-3-3 La proporción del área del pico (%) de cada cadena es calculada para el total de los valores corregidos de las áreas del pico de acuerdo a la siguiente expresión.

Expresión 3

15

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

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

A_{Li} , A_{Hi} : Valores corregidos de las áreas del pico respectivas de L_i y H_i

20

F-3-4 El número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por moléculas de anticuerpo en el conjugado anticuerpo-fármaco, es calculado de acuerdo a la siguiente expresión.

25

Número promedio de moléculas de fármaco conjugadas

= (proporción del área del pico $L_0 \times 0$ + proporción del área del pico $L_0 \times 1$ + proporción del área del pico $H_0 \times 0$ + proporción del área del pico $H_1 \times 1$ + proporción del área del pico $H_2 \times 2$ + proporción del área del pico $H_3 \times 3$) / 100×2

5

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

(maleimid-N-il)-(CH₂)^{n³}-C(=O)-L²-L^P-NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-(CH₂)^{n²}-C(=O)-(NH-DX)

10

En la fórmula,

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

L² representa -NH-(CH₂CH₂-O)^{n⁴}-CH₂CH₂-C(=O)- o un enlace sencillo,

en donde n^4 representa un número entero de 1 a 6,

15

L^P representa un residuo peptídico que consiste de 2 a 7 aminoácidos seleccionados de fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico, y ácido aspártico

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

20

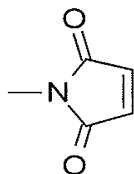
n^2 representa un número entero de 0 a 5,

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

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

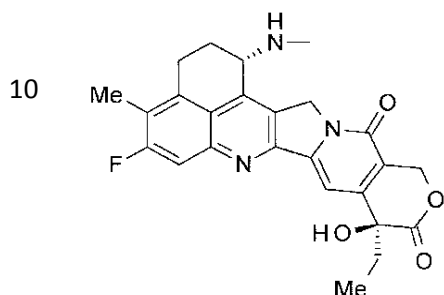
25

Fórmula 20



5 en donde el átomo de nitrógeno es una posición de
conexión, $-(NH-DX)$ es un grupo representado por la siguiente
fórmula:

Fórmula 21



10 en donde el átomo de nitrógeno del grupo amino en
15 la posición 1 es una posición de conexión.

Cuando L^2 es un enlace sencillo o $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-$
 $CH_2CH_2-C(=O)-$, un compuesto en el cual n^4 es un número entero
de 2 a 4 es preferido como un intermediario de producción.

Con respecto al residuo peptídico de L^P , un
20 compuesto que tiene un residuo peptídico que comprende un
aminoácido seleccionado de fenilalanina, glicina, valina,
lisina, citrulina, serina, ácido glutámico, y ácido
aspártico, es preferido como un intermediario de producción.
Entre estos residuos peptídicos, un compuesto en el cual L^P
25 es un residuo peptídico que consiste de 4 aminoácidos es

preferido como un intermediario de producción. Más específicamente, un compuesto en el cual L^P es un residuo tetrapeptídico de -GGFG- es preferido como un intermediario de producción.

5 Además, respecto al $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$, un compuesto que tiene $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, o $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ es preferido como un intermediario de producción. Un compuesto que tiene $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-$
10 CH_2- , o $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2$ es más preferido.

 Además, en el compuesto representado por la fórmula (2), un compuesto en el cual n^3 es un número entero de 2 a 5, L^2 es un enlace sencillo, y $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$ es $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$,
15 $-NH-CH_2-O-CH_2-$, o $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ es preferido como un intermediario de producción. Un compuesto en el cual $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$ es $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, o $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ es más preferido. Un compuesto en el cual n^3 es un número entero de 2 o 5 es adicionalmente
20 preferido.

 Además, en el compuesto representado por la fórmula (2), un compuesto en el cual n^3 es un número entero de 2 a 5, L^2 es $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$, n^4 es un número entero de 2 a 4, y $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$ es $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$,
25 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, o $-NH-$

CH₂CH₂-O-CH₂- es preferido como un intermediario de producción. Un compuesto en el cual n⁴ es un número entero de 2 o 4 es más preferido. Un compuesto en el cual -NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-(CH₂)^{n²}- es -NH-CH₂CH₂CH₂-, -NH-CH₂-O-CH₂-, o -NH-CH₂CH₂-O-CH₂- es adicionalmente preferido.

Como tales, los intermediarios preferidos útiles en la producción del compuesto de la presente invención, pueden ser ejemplificados los siguientes.

- (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- 10 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- 15 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- 20 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- (maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
- 25 DX),

- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -
(NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O) - (NH-DX) ,
- 5 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-
DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -
(NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
10 C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O) - (NH-
15 DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O) - (NH-
DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O) -
(NH-DX) ,
- 20 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O) - (NH-
DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O) - (NH-
DX) ,
- (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O) -
25 (NH-DX) ,

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

5 (maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

El conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la
10 presente invención puede ser producido mediante la reacción
de un compuesto fármaco-ligador, seleccionado del grupo
anteriormente descrito de los compuestos intermediarios de
producción con un anticuerpo anti-TROP2 o un derivado
reactivo del mismo, y formando un enlace tioéter en un sitio
15 de enlace disulfuro presente en la parte de bisagra del
anticuerpo anti-TROP2. En este caso, un derivado reactivo
del anticuerpo anti-TROP2 es preferentemente utilizado.
Particularmente, un derivado reactivo obtenido mediante la
reducción del anticuerpo anti-TROP2 es preferido.

20 Los siguientes son compuestos más preferidos como
intermediarios de producción.

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-
25 DX),

(maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) -
(NH-DX) ,

(maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O) - (NH-DX) ,

5 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O) -
(NH-DX) ,

(maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O) - (NH-DX) ,

(maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -
10 GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,

(maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -
GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,

(maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) .

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

(maleimid-N-il) -CH₂CH₂-C(=O) -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O) -
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O) - (NH-DX) ,

20 (maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O) -
(NH-DX) , o

(maleimid-N-il) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O) - (NH-DX) ,

es un compuesto adicionalmente preferido.

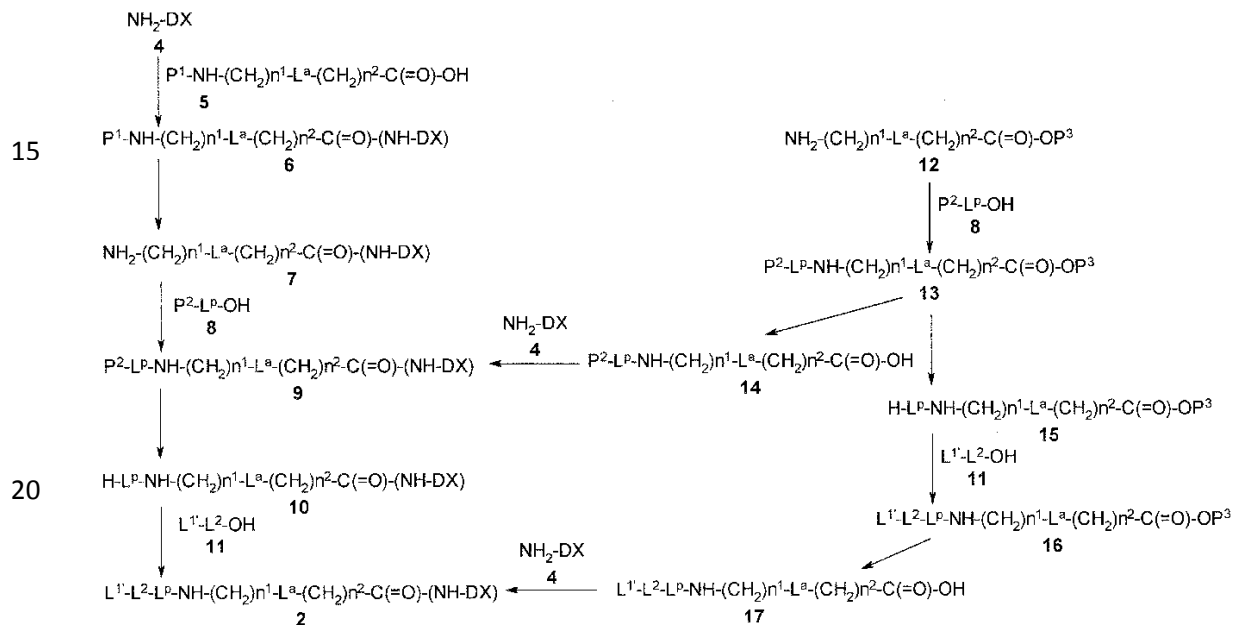
25 Con el fin de asegurar la cantidad del conjugado,

una pluralidad de conjugados obtenidos mediante condiciones de producción similares para tener un número equivalentes de fármaco (por ejemplo, aproximadamente ± 1) pueden ser mezclados para preparar nuevos lotes. En este caso, el número promedio de fármacos cae entre los números promedio de fármacos en los conjugados antes del mezclado.

2. Método de producción 2

El compuesto representado por la fórmula (2) como un intermediario utilizado en el método de producción previo y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede ser producido mediante el siguiente método, por ejemplo.

Fórmula 22



En la fórmula, $\text{L}^{1'}$ representa un grupo maleimidilo, y P^1 , P^2 , y P^3 cada uno representa un grupo protector.

El compuesto (6) puede ser producido mediante la

derivatización del ácido carboxílico (5) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similar y haciéndolo reaccionar con $\text{NH}_2\text{-DX}$ (4) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en presencia de una
 5 base. $\text{NH}_2\text{-DX}$ (4) representa el exatecán (nombre químico: (1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-diona).

Los reactivos de reacción y las condiciones que son
 10 comúnmente utilizadas para la síntesis peptídica pueden ser empleados para la reacción. Existen varios tipos de éster activo. Por ejemplo, éste puede ser producido mediante la reacción de los fenoles tales como p-nitrofenol, N-hidroxibenzotriazol, N-hidroxisuccinimida, o similares, con
 15 el ácido carboxílico (5) utilizando un agente de condensación tal como la N,N'-diciclohexilcarbodiimida o el clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Además, el éster activo puede ser también producido mediante reacción del ácido carboxílico (5) con trifluoroacetato de
 20 pentafluorofenilo o similar; una reacción del ácido carboxílico (5) con el hexafluorofosfito de 1-benzotriazolil-oxitripirrolidinofosfonio; una reacción del ácido carboxílico (5) con el cianofosfonato de dietilo (método de salación); una reacción del ácido carboxílico (5) con trifenilfosfina y
 25 disulfuro de 2,2'-dipiridilo (método de Mukaiyama); una

reacción del ácido carboxílico (5) con un derivado de triazina tal como el cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM); o similares. Además, la reacción puede ser también realizada mediante, por ejemplo, un método de haluro de ácido por el cual el ácido carboxílico (5) es tratado con haluro de ácido tal como cloruro de tionilo y cloruro de oxalilo en presencia de una base.

Mediante la reacción del éster activo, el anhídrido de ácido mixto o el haluro de ácido del ácido carboxílico (5) obtenido como se describe anteriormente con el compuesto (4), en presencia de una base adecuada en un solvente inerte a una temperatura de reacción de -78°C hasta 150°C , puede ser producido el compuesto (6). Mientras tanto, "solvente inerte" indica un solvente que no inhibe una reacción objetivo para la cual es utilizado el solvente.

Ejemplos específicos de la base utilizada para cada paso descrito anteriormente pueden incluir carbonato, alcóxido, hidróxido, o hidruro de un metal alcalino o metal alcalinotérreo incluyendo carbonatos de sodio, carbonato de potasio, etóxido de sodio, butóxido de potasio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidruro de sodio e hidruro de potasio, la base organometálica representada por un alquil-litio incluyendo n-butil-litio, dialquilamino-litio incluyendo diisopropilamida de litio; la base organometálica

de la bis-sililamina incluyendo bis(trimetilsilil)amida de litio; y la base orgánica incluyendo la amina terciaria o el compuesto heterocíclico que contiene nitrógeno, tal como piridina, 2,6-lutidina, colidina, 4-dimetilaminopiridina, trietilamina, N-metilmorfolina, diisopropiletilamina, y diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU).

Los ejemplos del solvente inerte que es utilizado para la reacción de la presente invención incluyen un solvente hidrocarburo halogenado tal como diclorometano, cloroformo, y tetracloruro de carbono; un solvente éter tal como tetrahidrofurano, 1,2-dimetoxietano, y dioxano; un solvente hidrocarburo aromático tal como benceno y tolueno; y un solvente amida tal como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, y N-metilpirrolidin-2-ona. Además de ellos, un solvente sulfóxido tal como sulfóxido de dimetilo y sulfolano; un solvente tipo cetona tal como acetona y metiletilcetona; y un solvente alcohólico tal como metanol y etanol pueden ser utilizados en algunos casos. Además, estos solventes pueden ser mezclados para el uso.

Respecto al grupo protector P^1 para el grupo amino terminal del compuesto (6), un grupo protector para un grupo amino que es en general utilizado para la síntesis de péptidos, por ejemplo, el grupo terc-butiloxycarbonilo, el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, y el grupo benciloxycarbonilo, pueden ser utilizadas. Los ejemplos de

otro grupo protector para un grupo amino puede incluir un grupo alcanoilo tal como el grupo acetilo; un grupo alcoxycarbonilo tal como el grupo metoxycarbonilo y grupo etoxycarbonilo; un grupo arilmetoxycarbonilo tal como el grupo parametoxibenciloxycarbonilo, y el grupo para (u
5 orto)nitrobenciloxycarbonilo; un grupo arilmetilo tal como el grupo bencilo y el grupo trifenilmetilo; un grupo aroilo tal como el grupo benzoilo; y un grupo arilsulfonilo tal como el grupo 2,4-dinitrobencensulfonilo y el grupo
10 ortonitrobencensulfonilo. El grupo protector P^1 puede ser seleccionado dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de un compuesto que tiene un grupo amino que va a ser protegido.

Mediante la desprotección del grupo protector P^1 para el grupo amino terminal del compuesto (6) obtenido,
15 puede ser producido el compuesto (7). Para esta desprotección, los reactivos y las condiciones pueden ser seleccionados dependiendo del grupo protector.

El compuesto (9) puede ser producido mediante la derivatización del ácido péptido-carboxílico (8) que tiene el
20 extremo N protegido con P^2 en un éster activo, anhídrido de ácido mixto o similar, y haciéndolo reaccionar con el compuesto (7) obtenido. Las condiciones de reacción, los reactivos, la base, y el solvente inerte utilizados para formación de un enlace peptídico entre el ácido péptido-
25 carboxílico (8) y el compuesto (7), pueden ser adecuadamente

seleccionados y utilizados a partir de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^2 puede ser adecuadamente seleccionado y utilizado a partir de aquellos descritos para el grupo protector del compuesto (6),
5 y la selección puede ser realizada con base en, por ejemplo, las propiedades del compuesto que tiene un grupo amino que va a ser protegido. Como es utilizado en general para la síntesis de péptidos, al repetir secuencialmente la reacción y la desprotección del aminoácido o del péptido que
10 constituye el ácido péptido-carboxílico (8) para el alargamiento, puede ser también producido el compuesto (9).

Mediante la desprotección del grupo protector P^2 para el grupo amino del compuesto (9) obtenido, el compuesto (10) puede ser producido. Para esta desprotección, los
15 reactivos y las condiciones pueden ser seleccionadas dependiendo del grupo protector.

Es posible producir el compuesto (2) mediante la derivatización del ácido carboxílico (11) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similar y
20 haciéndolo reaccionar con el compuesto (10) obtenido. Las condiciones de reacción, los reactivos, la base, y el solvente inerte utilizados para la formación de un enlace peptídico entre el ácido carboxílico (11) y el compuesto (10) pueden ser adecuadamente seleccionados y utilizados de
25 aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (9) puede ser también producido mediante el siguiente método, por ejemplo.

El compuesto (13) puede ser producido mediante la derivatización del ácido péptido-carboxílico (8) que tiene el
5 extremo N protegido con P^2 en éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similar y haciéndolo reaccionar en presencia de una base con el compuesto de amina (12) que tiene el grupo carboxilo protegido con P^3 . Las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el solvente inerte utilizados para la
10 formación de un enlace peptídico entre el ácido péptido-carboxílico (8) y el compuesto (12), pueden ser adecuadamente seleccionados y utilizados de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

El grupo protector P^2 para el grupo amino del
15 compuesto (13) puede ser protegido con un grupo protector que es comúnmente utilizado.

Específicamente, los ejemplos del grupo protector para un grupo hidroxilo incluyen un grupo alcoximetilo tal como el grupo metoximetilo; un grupo arilmetilo tal como el
20 grupo bencilo, el grupo 4-metoxibencilo, y el grupo trifenilmetilo; un grupo alcanilo tal como el grupo acetilo; un grupo aroilo tal como el grupo benzoilo; y un grupo sililo tal como el grupo terc-butil-difenilsililo. El grupo carboxilo puede ser protegido, por ejemplo, como un éster con
25 un grupo alquilo tal como el grupo metilo, grupo etilo, grupo

terc-butilo, un grupo alilo, o un grupo arilmetilo tal como el grupo bencilo. Los ejemplos del grupo protector para un grupo amino incluyen, por ejemplo, un grupo alquiloxicarbonilo tal como el grupo terc-butiloxicarbonilo, 5 el grupo metoxicarbonilo, y el grupo etoxicarbonilo; el grupo aliloxicarbonilo, o un grupo arilmetoxicarbonilo tal como el grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, el grupo benciloxicarbonilo, el grupo parametoxibenciloxi, y el grupo para-(u orto)nitrobenciloxicarbonilo; un grupo alcanilo tal 10 como el grupo acetilo; un grupo arilmetilo tal como el grupo bencilo y el grupo trifenilmetilo; un grupo aroilo tal como el grupo benzoilo; y un grupo arilsulfonilo tal como el grupo 2,4-dinitrobencensulfonilo o el grupo ortonitrobencensulfonilo.

15 Respecto al grupo protector P^3 para un grupo carboxilo, un grupo protector comúnmente utilizado como un grupo protector para un grupo carboxilo en la química de síntesis orgánica, en particular, puede ser utilizada la síntesis de péptidos. Los ejemplos específicos incluyen los 20 ésteres con un grupo alquilo tal como un grupo metilo, un grupo etilo, o un grupo terc-butilo, ésteres de alilo y ésteres de bencilo, y el grupo protector puede ser adecuadamente seleccionado de los grupos protectores anteriormente descritos. En tal caso, se prefiere que el 25 grupo protector para un grupo amino y el grupo protector para

un grupo carboxilo pueden ser aquellos preferentemente removidos por un método diferente o por condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la cual P^2 es un grupo terc-
5 butiloxicarbonilo y P^3 es un grupo bencilo. Los grupos protectores pueden ser seleccionados de las onas anteriormente mencionadas dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de un compuesto que tiene un grupo amino y un grupo carboxilo que va a ser protegido. Para la eliminación
10 de los grupos protectores, los reactivos y las condiciones pueden ser seleccionados dependiendo del grupo protector.

Mediante desprotección del grupo protector P^3 por el grupo carboxilo del compuesto (13) obtenido, puede ser producido el compuesto (14). Para esta desprotección, los
15 reactivos y las condiciones son seleccionados dependiendo del grupo protector.

El compuesto (9) puede ser producido mediante la derivatización del compuesto (14) obtenido en éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similar, y
20 haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, los reactivos y las condiciones de reacción que son en general utilizados para la síntesis de péptidos, pueden ser también utilizados, y las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el solvente inerte
25 utilizados para la reacción pueden ser adecuadamente

seleccionados de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (2) puede ser también producido mediante el siguiente método, por ejemplo.

5 Mediante desprotección del grupo protector P^2 por el grupo amino del compuesto (13), el compuesto (15) puede ser producido. Para esta desprotección, los reactivos y las condiciones pueden ser seleccionados dependiendo del grupo protector.

El compuesto (16) puede ser producido mediante la
10 derivatización del derivado ácido carboxílico (11) en éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similar, y haciéndolo reaccionar con el compuesto (15) obtenido en presencia de una base. Las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el solvente inerte utilizados para la
15 formación de un enlace amida entre el ácido péptido-carboxílico (11) y el compuesto (15), pueden ser adecuadamente seleccionados de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

Mediante la desprotección del grupo protector para
20 el grupo carboxilo del compuesto (16) obtenido, puede ser producido el compuesto (17). Esta desprotección puede ser llevada a cabo de manera similar a la desprotección en el grupo carboxilo para la producción del compuesto (14).

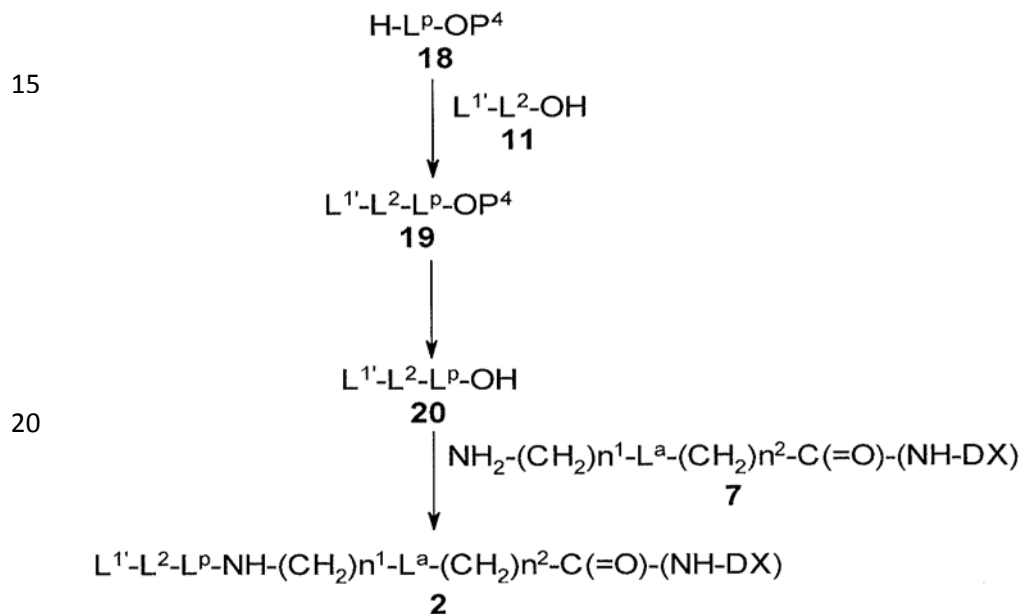
El compuesto (2) puede ser producido mediante la
25 derivatización del compuesto (17) en éster activo, anhídrido

de ácido mixto, haluro de ácido, o similar, y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, los reactivos y las condiciones de reacción que son en general utilizados para la síntesis de péptidos, pueden ser también utilizados, y las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el solvente inerte utilizados para la reacción pueden ser adecuadamente seleccionados de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

3. Método de producción 3

El compuesto representado por la fórmula (2) de un intermediario puede ser también producido mediante el siguiente método.

Fórmula 23



En la fórmula, $\text{L}^{1'}$ corresponde a L^1 que tiene una estructura en la cual el extremo es convertido a un grupo

maleimidilo, y P⁴ representa un grupo protector.

El compuesto (19) puede ser producido mediante la derivatización del compuesto (11) en éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similar, y haciéndolo reaccionar en presencia de una base con el ácido péptido-carboxílico (18) que tiene el extremo C protegido con P⁴. Las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el solvente inerte utilizados para la formación de un enlace peptídico entre el ácido péptido carboxílico (18) y el compuesto (11), pueden ser adecuadamente seleccionados de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P⁴ para el grupo carboxilo del compuesto (18) puede ser adecuadamente seleccionado del grupo protector descrito anteriormente.

Mediante la desprotección del grupo protector para el grupo carboxilo del compuesto (19) obtenido, puede ser producido el compuesto (20). Esta desprotección puede ser llevada a cabo de manera similar a la desprotección del grupo carboxilo para producir el compuesto (14).

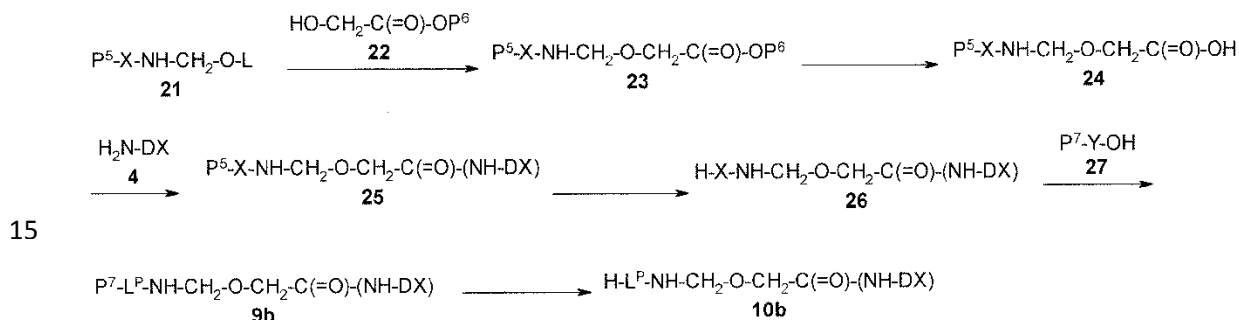
El compuesto (2) puede ser producido mediante la derivatización del compuesto (20) obtenido en éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similar, y haciéndolo reaccionar con el compuesto (7). Para la reacción, los reactivos y condiciones de reacción que son en general utilizados para la síntesis de péptidos, pueden ser también utilizados y las condiciones de reacción, los reactivos, la base y el solvente

inerte utilizados para la reacción pueden ser adecuadamente seleccionados de aquellos descritos para la síntesis del compuesto (6).

4. Método de producción 4

Enseguida, se describe con detalle el método para producir el compuesto (10b) que tiene $n^1 = 1$, $L^a = O$ en el intermediario de producción (10) descrito en el Método de producción 2. El compuesto representado por la fórmula (10b), una sal o un solvato del mismo puede ser producido de acuerdo al siguiente método, por ejemplo.

Fórmula 24



En la fórmula, L^p es como se definió anteriormente, L representa un grupo acilo que es un grupo alcanilo tal como un grupo acetilo o un grupo aloilo tal como un grupo benzoilo, un átomo de hidrogeno o similar, X e Y cada uno representan un oligopéptido que consiste de 1 a 3 aminoácidos, P^5 y P^7 cada uno representan un grupo protector para un grupo amino, y P^6 representa un grupo protector para un grupo carboxilo.

Un compuesto representado por la fórmula (21) puede ser producido mediante el uso o aplicación del método descrito en la Patente Japonesa Abierta al Público No. 2002-60351 o la literatura (J. Org. Chem., Vol. 51, página 3196, 5 1986), y, mediante la conducción de la eliminación de los grupos protectores o la modificación de los grupos funcionales, si es necesario. Alternativamente, éste puede ser también obtenido mediante tratamiento de un aminoácido con un grupo amino terminal protegido o una amida de ácido 10 del oligopéptido con el grupo amino protegido, con aldehído o cetona.

Mediante la reacción del compuesto (21) con el compuesto (22) que tiene un grupo hidroxilo a una temperatura que va desde las condiciones de temperatura de enfriamiento 15 hasta la temperatura ambiente en un solvente inerte en presencia de un ácido o una base, puede ser producido el compuesto (23).

Los ejemplos del ácido que puede ser utilizado aquí pueden incluir los ácidos inorgánicos tales como ácido 20 fluorhídrico, cloruro de hidrógeno, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y ácido bórico; un ácido orgánico tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido paratoluensulfónico y ácido metansulfónico; y un ácido de Lewis tal como tetrafluoroborato, cloruro de zinc, cloruro de 25 estaño, cloruro de aluminio y cloruro de hierro. Entre ellos,

los ácidos sulfónicos, particularmente, el ácido paratoluensulfónico son preferibles. Con respecto a la base, cualquiera de las bases anteriormente mencionadas puede ser adecuadamente seleccionada y utilizada. Los ejemplos
5 preferidos de las mismas incluyen un alcóxido de metal alcalino tal como el terc-butóxido de potasio; un hidróxido de metal alcalino tal como el hidróxido de sodio y el hidróxido de potasio; hidruro de metal alcalino tal como hidruro de sodio e hidruro de potasio; base organometálica
10 representada por dialquilamino-litio tal como la diisopropilamida de litio; y una base organometálica de bis-sililamina tal como bis(trimetilsilil)amida de litio. En los ejemplos del solvente que va a ser utilizado para la reacción incluyen un solvente tipo éter tal como el tetrahidrofurano y
15 el 1,4-dioxano; y un solvente hidrocarburo aromático tal como el benceno y el tolueno. Estos solventes pueden ser preparados como una mezcla con agua. Además, el grupo protector para un grupo amino como es ejemplificado por P⁵, no está particularmente limitado si éste es un grupo comúnmente
20 utilizado para la protección de un grupo amino. Los ejemplos representativos incluyen los grupos protectores para un grupo amino, que son descritos en el método de producción 2. Sin embargo, en la presente reacción, puede existir un caso en el cual el grupo protector para un grupo amino, como es
25 ejemplificado por P⁵, es escindido. En tal caso, es necesario

realizar una reacción con un reactivo adecuado para proteger un grupo amino, ya que puede ser requerido para introducir el grupo protector nuevamente.

El compuesto (24) puede ser producido mediante la
5 eliminación del grupo protector P^6 del compuesto (23). En la presente, los ejemplos representativos del grupo protector para un grupo carboxilo como se ejemplifica por P^6 , son descritos en el Método de producción 2, y uno adecuado puede ser seleccionado entre ellos. En el compuesto (23), es
10 deseable que el grupo protector P^5 para un grupo amino y el grupo protector P^6 para un grupo carboxilo sean los grupos protectores que pueden ser eliminados mediante un método diferente o por diferentes condiciones. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la cual P^5
15 es un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo y P^6 es un grupo bencilo. Los grupos protectores pueden ser seleccionados dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de un compuesto que tiene un grupo amino y un grupo carboxilo que va a ser protegido. Para la eliminación de los grupos protectores, los
20 reactivos y las condiciones son seleccionados dependiendo del grupo protector.

El compuesto (26) puede ser producido mediante la derivatización del ácido carboxílico (24) en éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similar, y
25 haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) o una sal

farmacológicamente aceptable del mismo para producir el compuesto (25), seguido por la eliminación del grupo protector P⁵ del compuesto (25) obtenido. Para la reacción entre el compuesto (4) y el ácido carboxílico (24), y la
5 reacción para la eliminación del grupo protector P⁶, pueden ser utilizados los mismos reactivos y las mismas condiciones de reacción que aquellas descritas para el Método de producción 2.

El compuesto (10b) puede ser producido mediante la
10 reacción del compuesto (26) con un aminoácido que tiene el grupo amino terminal protegido, o el oligopéptido (27) que tiene el grupo amino protegido, para producir el compuesto (9b) y eliminando el grupo protector P⁷ del compuesto (9b) obtenido. El grupo protector para un grupo amino como es
15 representado por P⁷, no está particularmente limitado si éste es en general utilizado para la protección de un grupo amino. Los ejemplos representativos del mismo incluyen los grupos protectores para un grupo amino, que son descritos en el Método de producción 2. Para la eliminación el grupo
20 protector, los reactivos y las condiciones son seleccionados dependiendo del grupo protector. Para la reacción entre el compuesto (26) y el compuesto (27), los reactivos y las condiciones de reacción que son comúnmente utilizados para la síntesis de péptidos, pueden ser empleados. El compuesto
25 (10b) producido por el método anteriormente mencionado puede

ser derivatizado en el compuesto (1) de la presente invención de acuerdo al método descrito anteriormente.

El conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención, cuando se deja en aire o se recristaliza, por ejemplo, para la purificación, puede absorber humedad para tener agua de adsorción o convertirse en un hidrato, y tal compuesto y una sal que contiene agua son también incluidos en la presente invención.

Un compuesto marcado con diversos isótopos radioactivos o no radioactivos, es también incluido en la presente invención. Uno o más átomos que constituyen el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención pueden contener un isótopo atómico a una proporción no natural. Los ejemplos del isótopo atómico incluyen deuterio (^2H), tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) y carbono 14 (^{14}C). Además, el compuesto de la presente invención puede ser marcado radioactivamente con un isótopo radioactivo tal como el tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I), carbono-14 (^{14}C), cobre-64 (^{64}Cu) zirconio-89 (^{89}Zr), yodo-124 (^{124}I), flúor-18 (^{18}F), indio-111 (^{111}In), carbono-11 (^{11}C) y yodo-131 (^{131}I). El compuesto marcado con un isótopo radioactivo es útil como un agente terapéutico o profiláctico, un reactivo para la investigación tal como un reactivo de ensayo y un agente para el diagnóstico, tal como un agente de formación de imagen de diagnóstico *in vivo*. Sin estar relacionado a la radioactividad, cualquier tipo

variante de isótopo del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención, está dentro del alcance de la presente invención.

Fármacos

5 El conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención muestra una actividad citotóxica contra las células cancerosas, y de este modo, puede ser utilizado como un fármaco, particularmente como un agente terapéutico y/o un agente profiláctico para el cáncer.

10 Es decir, el conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención puede ser selectivamente utilizado como un fármaco para quimioterapia, el cual es un método principal para tratar el cáncer, y como resultado, puede retrasar el desarrollo de las células cancerosas,
15 inhibir el crecimiento de las mismas, y además matar a las células cancerosas. Esto puede permitir a los pacientes con cáncer liberarse de los síntomas provocados por el cáncer o lograr el mejoramiento en QOL de los pacientes con cáncer, y logra un efecto terapéutico al sustentar la vida de los
20 pacientes con cáncer. Incluso si el conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención no logra matar a las células cancerosas, éste puede lograr un QOL más alto de los pacientes con cáncer, al tiempo que logra su supervivencia a largo plazo, mediante la inhibición o el
25 control del crecimiento de las células cancerosas.

En tal terapia farmacológica, éste puede ser utilizado como un fármaco solo, así como un fármaco en combinación con una terapia adicional en terapia con adyuvante, y puede ser combinado con operación quirúrgica, radioterapia, terapia hormonal, o similares. Además, éste puede ser también utilizado como un fármaco para la terapia farmacológica en terapia con neoadyuvante.

Además del uso terapéutico como se describe anteriormente, un efecto de supresión del crecimiento de las células cancerosas metastáticas diminutas y la muerte posterior de las mismas por el enlace a estas células cancerosas, puede ser también esperado en virtud de la propiedad de enlace del anticuerpo al antígeno. Particularmente, cuando la expresión de TROP2 es confirmada en las células cancerosas primarias, puede ser esperada la inhibición de la metástasis del cáncer o un efecto profiláctico, por la administración del conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención. Por ejemplo, un efecto de inhibición y muerte de las células cancerosas en un fluido corporal en el curso de la metástasis o un efecto de, por ejemplo, inhibición y muerte de las células cancerosas diminutas, inmediatamente después de la implantación en cualquier tejido, puede ser esperado. Además, puede ser esperada la inhibición de la metástasis del cáncer o un efecto profiláctico, particularmente, después de la

eliminación quirúrgica del cáncer. En consecuencia, puede ser esperado un efecto de la inhibición de la metástasis del cáncer.

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

Los ejemplos del tipo de cáncer a los cuales es aplicado el conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención, incluyen cáncer pulmonar, cáncer renal, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de mama, melanoma, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, o cáncer esofágico, no obstante, éste no se limita a los mismos, siempre y cuando sea una célula cancerosa que expresa, en una célula cancerosa como un sujeto de tratamiento, una proteína que el anticuerpo dentro del conjugado anticuerpo-fármaco, pueda reconocer.

El conjugado anticuerpo anti-TROP-fármaco de la presente invención puede ser preferentemente administrado a animal, pero es más preferentemente administrado a un humano.

Las sustancias utilizadas en una composición farmacéutica que contiene el conjugado anticuerpo anti-TROP2-

fármaco de la presente invención pueden ser adicionalmente seleccionadas y aplicadas a partir de los aditivos de formulación o similares, que son en general utilizados en la técnica, en vista de la dosis o la concentración de la administración.

El conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención puede ser administrado como una composición farmacéutica que contiene al menos un ingrediente farmacéuticamente adecuado. Por ejemplo, la composición farmacéutica anterior contiene típicamente al menos un portador farmacéutico (por ejemplo, líquido esterilizado). En la presente, el líquido incluye, por ejemplo, agua y aceite (aceite de petróleo y aceite de origen animal, de origen vegetal o de origen sintético). El aceite puede ser, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite mineral, o aceite de ajonjolí. El agua es un portador más típico cuando la composición farmacéutica anterior es intravenosamente administrada. La solución salina, una solución de dextrosa acuosa y una solución acuosa de glicerol pueden ser también utilizadas como un portador líquido, en particular, para una solución de inyección. Un vehículo farmacéutico adecuado es conocido en la técnica. Si se desea, la composición anterior puede también contener una cantidad en trazas de un agente humectante, un agente emulsificante, o un agente amortiguador del pH. En los ejemplos de portador

farmacéutico adecuado son descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W Martin. Las formulaciones corresponden a un modo de administración.

Diversos sistemas de distribución son conocidos, y
5 éstos pueden ser utilizados para administrar el conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención. Los ejemplos de la vía de administración incluyen las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea, pero no están limitadas a éstas. La
10 administración puede ser realizada mediante inyección o inyección de bolo, por ejemplo. De acuerdo a una modalidad preferida específica, la administración del conjugado anticuerpo-fármaco es llevada a cabo mediante inyección. La administración parenteral es una vía de administración
15 preferida.

De acuerdo a una modalidad representativa, la composición farmacéutica es prescrita, como una composición farmacéutica adecuada para la administración intravenosa a humanos, de acuerdo a los procedimientos convencionales. La
20 composición para la administración intravenosa es típicamente una solución en una solución amortiguadora acuosa estéril isotónica. Si es necesario, el fármaco puede contener un agente de solubilización y anestésicos locales para aliviar el dolor en el sitio de inyección (por ejemplo, lignocaína).
25 En general, el ingrediente anterior es proporcionado

individualmente como cualquiera de un polvo liofilizado o un concentrado anhidro contenido en un recipiente, el cual es obtenido mediante selladura en una ampolleta o un saco que tiene una cantidad del agente activo, o como una mezcla en una forma de dosis unitaria. Cuando el fármaco está en la forma de administración por inyección, éste puede ser administrado a partir de una botella de inyección que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando el fármaco es administrado mediante inyección, puede ser proporcionada una ampolleta de agua estéril o solución salina para la inyección, tal que los ingredientes anteriormente mencionados son mezclados uno con el otro antes de la administración.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que contiene únicamente el conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente solicitud, o una composición farmacéutica que contiene el conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco y al menos un agente del tratamiento del cáncer diferente del conjugado. El conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco de la presente invención puede ser administrado con otro agente del tratamiento del cáncer. El efecto anticanceroso puede ser mejorado en consecuencia. Otro agente anticanceroso utilizado para tal propósito puede ser administrado a un individuo simultáneamente con, separadamente de, o subsecuentemente al

conjugado anti-cuerpo-fármaco, y éste puede ser administrado mientras que se varía el intervalo de administración para cada uno. Los ejemplos del agente de tratamiento del cáncer incluyen abraxano, paclitaxel, cisplatino, gemcitabina, irinotecán (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinorelbina, los fármacos descritos en la Publicación Internacional No. WO 2003/038043, análogos de LH-RH (leuprorelina, goserilina o similares), fosfato de estramustina, antagonista de estrógeno (tamoxifeno, raloxifeno o similares), y un inhibidor de aromatasa (anastrozol, letrozol, exemestano o similares), pero éste no está limitado, siempre y cuando sea un fármaco que tenga una actividad antitumoral.

La composición farmacéutica puede ser formulada en una formulación de liofilización o en una formulación líquida, como una formulación que tiene la composición deseada y la pureza requerida. Cuando se formula como una formulación de liofilización, ésta puede ser una formulación que contiene aditivos de formulación adecuados que son utilizados en la técnica. También, para una formulación líquida, ésta puede ser formulada como una formulación líquida que contiene diversos aditivos de formulación que son utilizados en la técnica.

La composición y la concentración de la composición farmacéutica pueden variar dependiendo del

método de administración. Sin embargo, el conjugado anticuerpo anti-TROP2-fármaco, contenido en la composición farmacéutica de la presente invención puede mostrar el efecto farmacéutico, incluso a una dosis pequeña, cuando el
5 conjugado anti-cuerpo-fármaco tiene afinidad más alta por un antígeno, es decir, mayor afinidad (= valor de K_d más bajo) en términos de la constante de disociación (es decir, el valor de K_d) para el antígeno. De este modo, para determinar la dosis del conjugado anticuerpo-fármaco, la
10 dosis puede ser determinada en vista de una situación relacionada a la afinidad entre el conjugado anticuerpo-fármaco y el antígeno. Cuando el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención es administrado a un humano, por ejemplo, puede ser administrado aproximadamente
15 0.001 a 100 mg/kg una vez o administrado varias veces con un intervalo de una vez para 1 a 180 días.

Ejemplos

La presente invención es específicamente descrita en vista de los ejemplos mostrados enseguida. No obstante, la
20 presente invención no está limitada a éstos. Además, ésta no es de ningún modo interpretada de una manera limitante. Además, a no ser que se describa específicamente de otro modo, el reactivo, el solvente, y el material inicial descritos en la especificación pueden ser fácilmente
25 obtenidos de un proveedor comercial.

Ejemplo 1: Inmunización de ratón y obtención de hibridoma**1-1) Preparación de la célula que va a ser utilizada en la inmunización de ratones**

5 5×10^6 células NCI-H322 (línea de células de
cáncer pulmonar no microcítico humano, ATCC CRL-5806; ATCC:
American Type Culture Collection) fueron cultivadas en un
medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640) (10
ml) por 5 días, luego se recuperaron, se lavaron con PBS
(solución salina amortiguada con fosfato) dos veces, y se
10 resuspendieron en PBS (500 μ l).

1-2 Inmunización de ratones

Para la primera inmunización, cada ratón BALB/c (6
semanas de edad) fue intraperitonealmente inmunizado con las
células NCI-H322 (1×10^7 células). Para la segunda a quinta
15 inmunizaciones, los ratones fueron intraperitonealmente
inmunizados con 1×10^6 células NCI-H322 a intervalos de 1
semana. Para la sexta inmunización (final), el ratón fue
inmunizado a través de la vena de la cola e
intraperitonealmente con las células HNCI-H322 a 1×10^6
20 células/200 μ l PBS para cada vía. Las células del bazo fueron
extirpadas tres días después de la inmunización final.

1-3) Preparación de las células del bazo de ratones inmunizados

El bazo de los ratones inmunizados fue extirpado,
25 luego triturado, y suspendido en un medio RPMI 1640 al 10 %

de FBS (suero fetal bovino)(+). La suspensión celular fue pasada a través de un tamiz celular (100 μ m, BD Falcon) y luego se centrifugaron a 1500 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos, y el sobrenadante fue desechado. Se agregó una
5 solución de Tris-NH₄Cl (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, 0.83 % de cloruro de amonio; 10 ml) al residuo, seguido por el tratamiento a temperatura ambiente por 5 minutos. Se agregó un medio RPMI 1640 FBS(+) (10 ml) a la suspensión celular, y la mezcla se pasó a través de un tamiz celular y luego se
10 centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. El sobrenadante fue desechado, y las células del bazo fueron resuspendidas en un medio RPMI 1640 FBS(-) (10 ml).

1-4) Preparación de células de mieloma

Las células P3U1 (línea celular de mieloma de
15 ratón) fueron recuperadas y centrifugadas a 1500 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. Se agregó una solución de EDTA (0.02 %) (10 ml) a las células P3U1, seguido por el tratamiento a 37°C por 5 minutos. La suspensión de células P3U1 fue centrifugada a 1500 rpm a temperatura ambiente por 5
20 minutos. El sobrenadante fue desechado y resuspendido en un medio RPMI 1640 FBS(-) (10 ml).

1-5) Fusión celular

Las células del bazo y las células de mieloma fueron mezcladas a una proporción de 5:1 y centrifugadas
25 (1200 rpm, 5 minutos). Las células obtenidas en la fracción

precipitada fueron perfectamente desprendidas, y luego se agregaron gradualmente a éstas polietilenglicol 4000 (PEG-4000; 1 ml) en aproximadamente 1 minuto con agitación. Posteriormente, se agregó un medio RPMI (1 ml) al fluido que contenía las células, varias veces con intervalo de 1 minuto, y fue luego agregado a éstas un medio RPMI para ajustar la cantidad total a 50 ml. La suspensión celular fue centrifugada (900 rpm, 5 minutos), y las células obtenidas en la fracción precipitada fueron levemente desprendidas y luego suavemente suspendidas en un medio HAT (medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino y Suplemento de Medio HAT; 100 ml). La suspensión fue surtida a 200 µl/pozo a una placa de 96 pozos para el cultivo y se cultivaron hasta 50 % de confluencia en una incubadora de 5 % de CO₂ a 37°C.

15 1-6) Selección del hibridoma utilizando el adenovirus variante FZ33

Las células NCI-H322 fueron sembradas a 5×10^3 células/pozo a una placa de 96 pozos, y cultivadas a 37°C por 48 horas. Las células fueron lavadas con 150 µl/pozo de PBS dos veces, y cada sobrenadante del cultivo de hibridoma (50 µl) fue agregado a cada pozo y se hizo reaccionar a 4°C por 1 hora. Las células fueron lavadas con 150 µl/pozo de PBS dos veces. Un adenovirus Ax3CAZ3-FZ33 (adenovirus que expresa β-galactosidasa, modificado con fibra Z33 para enlazarse así a un anticuerpo (ver Solicitud de Patente de los Estados Unidos

25

Publicación No. 2012/0237518)) fue diluido con un medio RPMI1640(-) a una concentración de 3×10^6 vp/100 μ l (1×10^3 vp/células), y esta solución diluida fue agregada a la misma a 100 μ l/pozo. Después de la reacción a 4°C por 1 hora, las
5 células fueron lavadas con 150 μ l/pozo de PBS dos veces. Se agregó a éste un medio RPMI164 FBS(+) a 100 μ l/pozo, y las células fueron cultivadas a 37°C por 24 horas. Las células NCI-H322 tratadas con el ensayo del gen reportero de β -Gal utilizando el Sistema de Ensayo de Gen Reportero Galacto-Ligh
10 Plus (Applied Biosystems, Inc.) fueron lavadas con 200 μ l/pozo de PBS. La Solución de Lisis fue agregada a ésta a 50 μ l/pozo, y la mezcla se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos. Este lisado celular (10 μ l) fue diluido 100 veces con Diluyente de Amortiguador de Reacción Galacton-Plus
15 Galacto, luego se agregó a una placa de 96 micropozos White SH 96 (Nunc/Thermo Fisher Scientific, Inc.), y se hizo reaccionar a temperatura ambiente por 1 hora. Se agregó Accelerator II a ésta a 150 μ l/pozo. La quimioluminiscencia fue medida por 5 segundos utilizando un contador de marcador
20 múltiple Wallac 1429 ARVOSx (PerkinElmer, Inc.), y la dosis infecciosa del virus en las células NCI-H322 fue indicada con el valor promedio por segundo como RLU (cantidad de luminiscencia). En la selección del grupo de hibridoma realizada de este modo, un clon cuyo valor de medición (RLU)
25 fue de 5000 RLU o más alto fue seleccionado del grupo

completo (mínimo: 1383 RLU, promedio: 10914 RLU, máximo: 78746 RLU). Primeramente, como selección primaria, fueron seleccionados 81 pozos positivos de los 960 pozos de hibridoma obtenidos por una fusión celular. Como selección de validación, el ensayo fue además conducido por duplicado mediante el mismo procedimiento que en la selección primaria. Cuando un pozo que mostró un valor de medición de 5000 RLU o más alto en ambas pruebas fue considerado como positivo, 52 pozos positivos fueron seleccionados de los 81 pozos obtenidos en la selección primaria. Los clones seleccionados fueron subclonados 2 a 4 veces para establecer 44 líneas celulares de hibridoma monoclonal.

Ejemplo 2: Purificación del anticuerpo de hibridoma

El pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano; 0.5 ml) fue intraperitonealmente administrado previamente a cada ratón de 8 a 10 semanas de edad o ratón desnudo, el cual fue luego criado por 2 semanas. Cada hibridoma productor de anticuerpo monoclonal obtenido en el Ejemplo 1 fue intraperitonealmente inyectado al ratón. Después de 10 a 21 días, se permitió que el hibridoma provocara canceración ascítica y los fluidos de ascitis fueron luego recolectados. Los fluidos de ascitis obtenidos fueron centrifugados para eliminar el material sólido. Posteriormente, los anticuerpos fueron purificados mediante desplazamiento salino con sulfato de amonio del 40 al 50 %, un método de precipitación con

ácido caprílico, una columna de DEAE-Sepharose, y una columna de proteína G, y las fracciones de IgG o IgM fueron recolectadas y utilizadas como los anticuerpos monoclonales purificados.

5 **Ejemplo 3: Identificación del antígeno al cual se enlaza el anticuerpo producido por el hibridoma**

Un antígeno fue identificado para TINA1, un anticuerpo producido por el hibridoma preparado en el Ejemplo 2.

10 **3-1) Inmunoprecipitación de la proteína de la superficie celular, marcada con biotina, utilizado el anticuerpo TINA1**

5 x 10⁶ NCI-H322 fueron recuperadas y lavadas con PBS tres veces. Se suspendió EZ-Link Sulfo-NHS-Biotina (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Inc.) en PBS a una
15 concentración de 0.1 mg/ml. Las células NCI-H322 fueron agitadas a temperatura ambiente por 30 minutos en solución de biotina/PBS, luego lavadas con solución de glicina/100 mM/PBS (25 ml) dos veces, y luego lavadas con PBS (25 ml) tres veces. Las células lavadas de este modo fueron resuspendidas
20 en un amortiguador de lisis (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, 1 % de NP-40 + inhibidor de proteasa, 1 tableta/50 ml de EDTA Completo libre (Hoffmann-La Roche Ltd.); 2 ml) y se trataron a 4°C por 30 minutos. Sepharose de Proteína G/amortiguador de lisis (suspensión al 50 %; 30 µl) obtenido
25 mediante el remplazo de un amortiguador de Proteína G

Sepharose (Proteína G Sepharose 4 de Flujo Rápido (GE Healthcare Japan Corporation)) con un amortiguador de lisis fue agregado al lisado celular, y la mezcla se agitó a 4°C por 1 hora y luego se centrifugó a 4°C por 5 minutos para recuperar un sobrenadante. El anticuerpo TINA1 (3 µg) fue agregado al sobrenadante, y la mezcla fue agitada a 4°C por 1 hora. Luego, la Proteína G Sepharose/amortiguador de lisis (suspensión al 50 %; 60 µl) fue agregada a ésta, y la mezcla se agitó a 4°C por 2 horas. La Proteína G Sepharose fue lavada con amortiguador de lisis (1 ml) seis veces y luego resuspendida en 1 x amortiguador de muestra de SDS/amortiguador de 2-ME (2-mercaptoetanol) al 5 % (Tris HCl 62.5 mM (pH 6. a 25°C), 2 % (p/v) SDS, 10 % de glicerol, y 0.01 % (p/v) de rojo de fenol). La suspensión se trató a 100°C por 5 minutos, y la solución fue luego recuperada y utilizada como una muestra para SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida).

3-2) SDS-PAGE transferencia de Western

La muestra de SDS-PAGE preparada en el inciso 3-1) fue sometida a electroforesis a 20 mA utilizando Ready Gels J al 5-20 % (Bio-Rad Laboratories, Inc.) y luego se transfirió a 0.1 mA/cm² desde el gel hacia la membrana. La membrana fue lavada con PBS-T (PBS(-)-0.05 % de Tween 20) por 5 minutos y luego bloqueada por 1 hora. La membrana fue lavada por PBS-T por 5 minutos tres veces, y luego se hizo reaccionar con el

conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano (Amersham Biosciences Corp.; diluida a 2000 veces con PBS-T para el uso) por 1 hora. La membrana fue lavada con PBS-T por 10 minutos cuatro veces, y una banda objetivo fue luego detectada utilizando los reactivos de detección de transferencia de western ECL (Amersham Biosciences Corp.) e Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences Corp.). Las células NCI-H322 marcadas con biotina mediante los procedimientos del Ejemplo 3-1) fueron sometidas a inmunoprecipitación con el anticuerpo KCI7A3 cuyo antígeno fue ya encontrado como TROP2 mediante espectrometría de masa, o el anticuerpo TINA, y los productos inmunoprecipitados obtenidos fueron analizados mediante SDS-PAGE y transferencia de Western blot en presencia o ausencia de DTT. En cualquier caso del uso del anticuerpo KCI7A3 o el anticuerpo TINA1, fue detectada una banda a un peso molecular de 46 kDa en ausencia de DTT, y una banda fue detectada a un peso molecular de 37 kDa en las muestras suplementadas con DTT.

3-3) Análisis de FACS

Debido a que el antígeno del anticuerpo TINA1 fue predicho como TROP2 a partir del patrón de bandas, el análisis de sobreexpresión mediante transferencia de genes del cADN fue conducido sin espectroscopía de masa. Como resultado del análisis de FACS, el anticuerpo TINA1 mostró una fuerte respuesta positiva en las células CHOK1 que

expresan TROP2 humano, indicando que el antígeno del anticuerpo TINA1 es TROP2. Se condujo el análisis de FACS similar, utilizando una línea celular de cáncer pulmonar PC14, una línea celular de cáncer pulmonar NCI-H322, una
 5 línea celular de cáncer pulmonar NCI-H2122, una línea celular de cáncer pulmonar LCAM1, una línea celular de cáncer pulmonar LC2/ad, una línea celular de cáncer pancreático MIAPaCa2, una línea celular de cáncer pancreático PK-1, una línea celular de cáncer de próstata PC3, una línea celular de
 10 cáncer colorrectal, HCT116, una línea celular de melanoma A375, una línea celular de cáncer de ovario SKOV3, una línea celular de tumor hematopoyético RPMI8226, una línea celular de tumor hematopoyético K562, PBMC (células mononucleares de sangre periférica humana), y plaquetas humanas. Todas las
 15 líneas celulares de cáncer pulmonar, examinadas, fueron positivas a TROP2, y PC3, PK1 y SKOV3 fueron positivas como las líneas celulares, excepto por aquellas del cáncer pulmonar. Por otra parte, todas las células sanguíneas normales fueron negativas.

20 **Ejemplo 4: Medición de la actividad de internalización del anticuerpo**

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

Una proteína de fusión recombinante DT3C fue
 25 producida para el propósito de medir la actividad de

internalización y la actividad de inmunotoxina de un anticuerpo. Esta proteína DT3C es una proteína que tiene un dominio catalítico de la toxina de la difteria (DT) y tres regiones de enlace al anticuerpo de la proteína G. DT3C se
5 enlaza específicamente a una porción Fc de un anticuerpo, es estable, e induce la muerte celular por inhibición de la síntesis de proteína cuando es absorbida dentro de las células. Mediante el uso de este sistema, puede ser observado al mismo tiempo el efecto de internalización del anticuerpo y
10 el efecto citocidal del mismo por la inmunotoxina (Yamaguchi, M., Hamada, H., et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 454 (2014) 600-603).

4-2 (Evaluación de la actividad de internalización y actividad de inmunotoxina utilizando DT3C)

15 4 µg/ml de DT3C fue agregada a 25 µl/pozo a una placa de 96 pozos, posteriormente los sobrenadantes de cultivo de 11 hibridomas obtenidos mediante el método del Ejemplo 1 o un método equivalente a éste, fueron cada uno agregados a 25 µl/pozo a la placa, y la placa fue incubada a
20 temperatura ambiente por 30 minutos. Los antígenos reconocidos por los anticuerpos producidos por los hibridomas diferentes del hibridoma que produce el anticuerpo TINA1, fueron confirmados de antemano como CD9, CD46, CD55, CD59, CD71, CD73, CD147, CD276, EpCAM, o EGFR. 2×10^4 células/ml
25 (medio RPMI1640 suplementado con 20 % de FBS Bajo de IgG) de

las células NCI-H322 se sembraron a éste 50 µl/pozo. Después de la incubación a temperatura ambiente por 30 minutos, las células fueron cultivadas por 3 días en una incubadora de CO₂ de 30°C. Después del cultivo, el sobrenadante fue removido, y se agregó 10 % de WST-10 % FBS-RPMI1640 a 100 µl/pozo a la placa. Después de la incubación por 1 hora en una incubadora de CO₂ a 37°C, el número de células vivas fue medido utilizando un lector de microplacas (DO₄₅₀ a DO₆₄₀, infinite 200, Tecan Trading AG). Entre los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridomas evaluadas, los anticuerpos contra CD59, CD71, EGFR, EpCAM, o TROP2 fueron confirmados como poseedores de fuerte actividad de internalización y actividad de inmunotoxina (Figura 10).

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

Cada solución diluida de DT3C (0, 0.004, 0.04, 0.4, 4, o 40 µg/ml) fue agregada a 25 µl/pozo a una placa de 96 pozos, luego cada anticuerpo (40 µg/ml) fue agregado a 25 µl/pozo a la placa, y la placa fue incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, 2×10^4 células/ml (medio RPMI1640 suplementado con 20 % de FBS Bajo en IgG) de las células NCI-H322 fueron sembradas a ésta a 50 µl/pozo. Después de la incubación a temperatura ambiente por 30 minutos, las células fueron cultivadas por 3 días en una

incubadora de CO₂ a 37°C. Después del cultivo, el sobrenadante fue retirado, y se agregó 10 % WST-1-10 % FBS-RPMI1640 a 100 µl/pozo, a la placa. Después de la incubación por 1 hora en una incubadora de CO₂ a 37°C, se midió el
 5 número de células vivas utilizando un lector de placas (DO₄₅₀ a DO₆₄₀). Entre los anticuerpos evaluados, TINA1, un anticuerpo contra TROP2, tuvo la más fuerte actividad de internalización y actividad de inmunotoxina (Figura 11).

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

Los anticuerpos TINA1 anti-TROP2 (inmunógeno: línea de cáncer pulmonar NCI-H322), KCL7A3 y KCL2D6 (inmunógeno: línea celular de cáncer pancreático KCL-MOH1), Pr1E11 y Pr8H10 (inmunógeno: línea celular de
 15 cáncer de próstata Pc-1), y NY16 y NY17 (inmunógeno: línea celular de cáncer pancreático PK-1) obtenidas mediante el método del Ejemplo 1 o un método equivalente a éste, y 77220 comercialmente disponible (R&D Systems Inc.) fueron evaluadas para su actividad de
 20 internalización y actividad de inmunotoxina de la misma manera que en el Ejemplo 4-3). Como resultado, entre los 8 anticuerpos anti-TROP2, el anticuerpo TINA1 tuvo la más fuerte actividad (Figura 12).

**Ejemplo 5: Determinación de la secuencia nucleotídica del
 25 cADN que codifica la región variable del gen del anticuerpo**

TINA1, y producción del anticuerpo quimérico TINA1 (de aquí en adelante, denominado como cTINA1)

5-1) Determinación de la secuencia nucleotídica del cADN que codifica la región variable del gen del anticuerpo TINA1

5 5-1-1) Preparación del mRNA proveniente del hibridoma productor del anticuerpo TINA1

Con el fin de amplificar los cADNs que codifican las regiones variables del anticuerpo TINA1, el mRNA fue preparado a partir del hibridoma productor del anticuerpo TINA1 utilizando el kit de aislamiento de mRNA (Roche Applied Science)

5-1-2) Síntesis del cADN (cADN-5'-RACE-Ready

El cADN (cADN 5'-RACE-Ready) fue sintetizado utilizando el mRNA (100 ng) preparado en el inciso 5-1-1), y el Kit de Amplificación de cADN SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.).

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

20 Se utilizaron UPM (Mezcla de Cebador Universal A: incluido en el Kit de Amplificación de cADN SMARTer RACE) y un oligonucleótido que tiene una secuencia de 5'-AGAGTTCCAGGTCAAGGTCAGG-3' (SEQ ID NO: 33: cebador mG2aVR2) como cebadores para amplificar el cADN de la región variable del gen de cadena pesada mediante PCR. UPM incluido

25

en el Kit de Amplificación de cADN SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) fue utilizado, y mG2aVR2 fue diseñado a partir de la secuencia de una región constante de cadena pesada de ratón (IgG2a) en una base de datos.

5 El cADN que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo TINA1 amplificado mediante PCR de 5'-RACE, utilizando este grupo de cebadores y el cADN (cADN de 5'RACE-Ready) sintetizado en el Ejemplo 5-1-2) como una plantilla. Esta PCR fue llevada a cabo de acuerdo al
10 manual del Kit de Amplificación de cADN SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) en el programa de PC de ensayo utilizando KOD-plus (Toyobo Co., Ltd.) como la polimerasa.

El cADN que codifica la región variable de cadena pesada, amplificado por PCR 5'-RACE fue purificado utilizando
15 el Kit de Purificación por PCR MinElute (QIAGEN N.V.) y luego clonado utilizando el Kit de Clonación por PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen Corp.). La secuencia nucleotídica del cADN que codifica la región variable de cadena pesada, clonado fue analizado mediante secuenciamiento. Los cebadores de
20 secuenciamiento utilizados fueron el cebador anteriormente descrito mG2aVR2 diseñado a partir de la secuencia de una región constante de cadena pesada de ratón en una base de datos, y NUP (Cebador Universal Anidado A: incluido en el Kit de Amplificación de cADN SMARTer RACE).

25 El análisis de secuenciamiento fue llevado a cabo

utilizando un aparato de análisis de la secuencia de genes ("Analizador de ADN ABI PRISM 3700" o "Analizador Applied Biosystems 3730xl", Applied Biosystems, Inc.), y la reacción de secuenciamiento empleó el Gen Amp 9700 (Applied Biosystems, Inc.).

La secuencia nucleotídica determinada del cADN que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo TINA1 es mostrada en la SEQ 1 del Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos codificada por ésta es mostrada en la SEQ ID NO: 2.

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

Se utilizaron UPM (Mezcla de Cebador Universal A: incluida en el Kit de Amplificación cADN SMARTer RACE) y un oligonucleótido que tenía una secuencia de 5'-AGTCCAACGTTCAGGACGCCATTTTGTCTG-3' (SEQ ID NO: 34: cebador mKVR2) como cebadores para amplificar el cADN de la región variable del gel de cadena ligera del anticuerpo TINA1 mediante PCR. Se utilizó UPM incluido en el Kit de Amplificación de cADN SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.), y mKVR2 fue diseñada a partir de la secuencia de una región constante de cadena ligera de ratón en una base de datos.

El cADN que codifica la región variable de cadena

ligera del anticuerpo TINA1 fue amplificado mediante PCR 5'-RACE utilizando este equipo de cebadores y el cADN (cADN 5'-RACE-Ready) sintetizado en el Ejemplo 5-1-2) como una plantilla. Esta PCR fue llevada de acuerdo al manual del Kit de Amplificación de cADN SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) sobre el programa de PCR de ensayo utilizando KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.) como la polimerasa.

El cADN que codifica para la región variable de cadena ligera, amplificado mediante PCR 5'-RACE fue purificado utilizando el Kit de Purificación por PCR MinElute (QIAGEN N.V.) y luego clonado utilizando el Kit de Clonación de PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen Corp.). La secuencia nucleotídica del cADN que codifica para la región variable de cadena ligera, clonado fue analizado mediante secuenciamiento.

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

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

La secuencia nucleotídica determinada del cADN que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo TINA1 es mostrada en la SEQ IN NO: 3 del Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos codificada por ésta

es mostrada en la SEQ ID NO: 4.

5-2) Producción del anticuerpo cTINA1

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

5 Un fragmento de aproximadamente 5.4 kb obtenido mediante digestión de un plásmido pcDNA3.3-TOPO/LacZ (Invitrogen Corp.) con las enzimas de restricción XbaI y PmeI, y un fragmento de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica una señal de secreción de la cadena κ humana y
10 una región constante de cadena κ humana mostrada en la SEQ ID NO: 5, fueron ligadas utilizando el kit de clonación por PCR In-Fusion Advantage (Clontech Laboratories, Inc.) para producir pcDNA3.3/LK.

 pcDNA3.3/LK fue utilizado como una plantilla en la
15 PCR utilizando un equipo de cebadores descrito más adelante. El fragmento obtenido de aproximadamente 3.8 kb fue fosforilado y luego autoligado para construir un vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo quimérico humanizado pCMA-LK, que tenía una secuencia de señal, un sitio de
20 clonación, y el gen de la región constante de la cadena κ humana con dirección 3' del promotor del CMV.

Grupo de cebadores

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

25 5'-gctatggcagggcctgccgccccgacgttg-3' (SEQ ID NO:

36: cebador 3.3-R1)

5-2-2) Construcción del vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo humanizado tipo IgG1, pCMA-G1

Un fragmento de ADN del pCMA-LK que carece de la
5 secuencia de ADN que codifica una señal de secreción de
cadena κ humana y una región constante de cadena κ humana
mediante digestión con XbaI y PmeI, y un fragmento de ADN que
contiene una secuencia de ADN que codifica los aminoácidos de
una secuencia de señal de cadena pesada humana y una región
10 constante de IgG1 humana mostrada en la SEQ ID NO: 6, fueron
ligados utilizando el Kit de clonación por PCR In-Fusion
Advantage (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un
vector de expresión pCMA-G1 de cadena pesada de anticuerpo
tipo IgG1, quimérico y humanizado, que tiene una secuencia de
15 señal, un sitio de clonación, y el gen de la región
constante de cadena pesada de IgG-1 humana, con dirección
3' del promotor de CMV.

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

20 Un fragmento de ADN que contiene el cADN que
codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo
TINA1 fue amplificado utilizando el cADN que codifica la
región variable de cadena pesada, obtenido en el Ejemplo
5-1-3) como una plantilla, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.),
25 y un grupo de cebadores descrito más adelante e insertado

hacia un sitio escindido por la enzima de restricción B1PI, del vector de expresión pCMA-G1 de cadena pesada tipo IgG1 quimérico y humanizado, utilizando el kit de clonación por PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para construir
 5 un vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo cTINA1. El vector de expresión obtenido fue designado como "pCMA-G1/cTINA1". La secuencia nucleotídica de cadena pesada del anticuerpo cTINA1 es mostrada en la SEQ ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos codificada por la misma es mostrada
 10 en la SEQ ID NO: 8. La secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 son también descritas en la Figura 1.

Grupo de cebadores para la cadena pesada del anticuerpo cTINA1

15 5'-CCAGATGGGTGCTGAGCCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAG-3' (SEQ ID NO: 37: cebador TINA1H-F)

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

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

Un fragmento de ADN que contenía el cADN que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo TINA1 fue amplificado utilizando un cADN que codifica la región variable de cadena ligera, obtenido en el Ejemplo 5-1-
 25 4), como una plantilla, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.), y un

grupo de cebadores descrito más adelante, e insertado hacia un sitio escindido por la enzima de restricción BsiWI del vector pCMA-LK para propósitos generales, de expresión de la cadena ligera del anticuerpo quimérico y humanizado, utilizando el kit de clonación por PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo cTINA1. El vector de expresión obtenido fue designado como "pCMA-LK/cTINA1". La secuencia nucleotídica de la cadena ligera del anticuerpo cTINA1 es mostrada en la SEQ ID NO: 9, y la secuencia de aminoácidos codificada por la misma es mostrada en la SEQ ID NO: 10. La secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 son también descritas en la Figura 2.

Grupo de cebadores para la cadena ligera del anticuerpo cTINA1

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

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

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

Las células FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) fueron subcultivadas y cultivadas de acuerdo al manual.

1 x 10⁷ células FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) en fase de crecimiento logarítmica fueron diluidas

con un medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.) hasta 9.6 ml, luego sembradas en una Botella de Almacenamiento Cuadrada de 30 ml (Nalgene/Thermo Fisher Scientific, Inc.), y luego cultivadas con agitación a 90 rpm por 1 hora en una incubadora de 8 % de CO₂ a 37°C. La polietilenimina (Polyscience #24765; 30 µg) fue disuelta en Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 200 µl). Luego, el vector de expresión de cadena ligera (6 µg) y el vector de expresión de cadena pesada (4 µg) preparados utilizando el kit del Plásmido PureLink HiPure (Invitrogen Corp.) fueron agregados al Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 200 µl). La solución mixta del vector de expresión/Opti-Pro SFM (200 µl) fue agregada a la solución mixta de polietilenimina/Opti-Pro SFM (200 µl), y la mezcla fue suavemente agitada, posteriormente dejada por 5 minutos, y luego adicionada a las células FreeStyle 293F. Un sobrenadante de cultivo obtenido mediante el cultivo en agitación a 90 rpm por 7 días en una incubadora de 8 % de CO₂ a 37°C, fue filtrado a través del filtro Minisart-Plus (Sartorius AG) y utilizado como una muestra para la evaluación.

El anticuerpo quimérico humano TINA1 obtenido por la combinación de pCMA-G1/cTINA1 y pCMA-LK/cTINA1 fue designado como el "anticuerpo cTINA1".

Ejemplo 6: Diseño del anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TROP2

6-1) Diseño de la versión humanizada de TINA1

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

5 La modelación molecular de las regiones variables de TINA1 fue llevada a cabo mediante un método conocido en la técnica como modelación por homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153 (1991)). Las regiones variables del TINA1 determinada anteriormente, fueron comparadas con las

10 secuencias primarias (estructuras tridimensionales derivadas de las estructuras de cristalografía de rayos X, están disponibles) de las regiones variables de inmunoglobulina humana registradas en Protein Data Bank (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)). Como resultado, 1ZEA fue seleccionado como

15 uno que tiene la más alta homología de secuencia a la región variable de cadena pesada de TINA1, entre los anticuerpos que tienen similarmente una supresión en sus estructuras. También, 3IU4 fue seleccionado como uno que tiene la más alta homología secuencial a la región variable de cadena ligera de

20 TINA1. Las estructuras tridimensionales de las regiones estructurales fueron preparadas como un "modelo estructural" mediante la combinación de los coordinados de 1ZEA y 3IU4 correspondientes a la cadena pesada y a la cadena ligera de TINA1. Subsecuentemente, la conformación típica de cada CDR

25 fue incorporada dentro del modelo estructural.

Finalmente, el cálculo energético para excluir el contacto interatómico desventajoso, fue conducido con el fin de obtener los posibles modelos moleculares de las regiones variables de TINA1 en términos de la energía. Estos
5 procedimientos fueron realizados utilizando un programa de predicción de la estructura tridimensional de proteína, comercialmente disponible de Discovery Studio (Accelrys, Inc,).

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

El anticuerpo TINA1 humanizado fue construido mediante un método conocido en la técnica como injerto de CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Un anticuerpo aceptor fue seleccionado con base en la homología
15 de los aminoácidos en las regiones estructurales. Las secuencias de las regiones estructurales de TINA1 fueron comparadas con las secuencias de todas las estructuras humanas registradas en la base de datos Kabat (Nuc. Acid Res., 29, 205-206 (2001)) de las secuencias de aminoácidos
20 del anticuerpo. Como resultado, un anticuerpo HuPR1A3 fue seleccionado como un aceptor debido a su 74 % de homología secuencial respecto a las regiones estructurales. Los residuos de aminoácidos de las regiones estructurales de HuPR1A3 fueron alineadas con los residuos de aminoácidos de
25 las regiones estructurales de TINA1 para identificar las

posiciones de los aminoácidos que no coinciden entre ellas. Las posiciones de estos residuos fueron analizados utilizando el modelo tri-dimensional de TINA1 anteriormente construido. Luego, los residuos donadores que van a ser injertados sobre el aceptor fueron seleccionados de acuerdo a los criterios proporcionados por Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci, USA 86, 10029-10033 (1989)). Algunos residuos donadores seleccionados de este modo fueron transferidos al anticuerpo aceptor para construir la secuencia TINA1 humanizada como se describe en los Ejemplos siguientes.

6-2) Humanización de la cadena pesada de TINA1

6-2-1) Cadena pesada tipo hTINA1-H1

Una cadena pesada de TINA1 humanizada diseñada mediante el involucramiento del remplazo de la posición del aminoácido 21 (isoleucina) con valina, posición del aminoácido 28 (prolina), con alanina, posición del aminoácido 30 (leucina) con valina, posición del aminoácido 35 (ácido glutámico) con alanina, posición del aminoácido 36 (treonina) con serina, posición del aminoácido 38 (arginina) con lisina, posición del aminoácido 39 (isoleucina) con valina, posición del aminoácido 57 (glutamina) con arginina, posición del aminoácido 58 (lisina) con glutamina, posición del aminoácido 59 (metionina) con alanina, posición del aminoácido 62 (lisina) con glutamina, posición del aminoácido 65 (lisina) con ácido glutámico, posición del aminoácido 67 (isoleucina)

con metionina, posición del aminoácido 87 (fenilalanina) con valina, posición del aminoácido 88 (alanina) con treonina, posición del aminoácido 89 (fenilalanina) con isoleucina, posición del aminoácido 91 (leucina) con alanina, posición del aminoácido 92 (ácido glutámico) con ácido aspártico, posición del aminoácido 95 (alanina) con treonina, posición del aminoácido 102 (isoleucina) con leucina posición del aminoácido 104 (asparagina) con serina, posición del aminoácido 107 (asparagina) con serina, posición del aminoácido 111 (treonina) con alanina, posición del aminoácido 112 (treonina) con valina, posición del aminoácido 114 (fenilalanina) con tirosina, posición del aminoácido 132 (alanina) con glutamina, y posición del aminoácido 135 (alanina) con leucina respecto a la cadena pesada de TINA1 mostrada en la SEQ ID NO: 8 del Listado de Secuencias fue designada como una "cadena pesada tipo hTINA1-H1".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hTINA1-H1 se describe en la SEQ ID NO: 12 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste de los residuos de aminoácidos 1 al 19, una secuencia que consiste de los residuos de aminoácidos 20 al 140, y una secuencia que consiste de los residuos de aminoácidos 141 al 470 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, corresponden a la secuencia de señal, la región variable de cadena pesada, y la región constante de cadena pesada, respectivamente. La

secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 se describe en la SEQ ID NO: 11 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste de los nucleótidos 1 al 57, una secuencia que consiste de los nucleótidos 58 al 420, y una secuencia que consiste de los nucleótidos 421 al 1410 en la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 11, codifican la secuencia de señal, la secuencia de la región variable de cadena pesada, y la secuencia de la región constante de cadena pesada, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 son también descritas en la Figura 3.

6-2-2) Cadena pesada tipo hTINA1-H2:

Una cadena pesada TINA1 humanizada diseñada por el involucramiento del remplazo de la posición del aminoácido 21 (isoleucina) con valina, la posición del aminoácido 28 (prolina) con alanina, posición del aminoácido 30 (leucina) con valina, posición del aminoácido 35 (ácido glutámico) con alanina, posición del aminoácido 36 (treonina) con serina, posición del aminoácido 38 (arginina) con lisina, posición del aminoácido 39 (isoleucina) con valina, posición del aminoácido 57 (glutamina) con arginina, posición del aminoácido 58 (lisina) con glutamina, posición del aminoácido 59 (metionina) con alanina, posición del aminoácido 62 (lisina) con glutamina, posición del aminoácido 65 (lisina)

con ácido glutámico, posición del aminoácido 67 (isoleucina) con metionina, posición del aminoácido 87 (fenilalanina) con valina, posición del aminoácido 88 (alanina) con treonina, posición del aminoácido 89 (fenilalanina) con isoleucina, 5 posición del aminoácido 92 (ácido glutámico) con ácido aspártico, posición del aminoácido 95 (alanina) con treonina, posición del aminoácido 102 (isoleucina) con leucina, posición del aminoácido 104 (asparagina) con serina, posición del aminoácido 107 (asparagina) con serina, posición del 10 aminoácido 111 (treonina) con alanina, posición del aminoácido 112 (treonina) con valina, posición del aminoácido 114 (fenilalanina) con tirosina, posición del aminoácido 132 (alanina) con glutamina, y la posición del aminoácido 135 (alanina) con leucina respecto a la cadena pesada de TINAl 15 mostrada en la SEQ ID NO: 8 del Listado de Secuencias, fue designada como "cadena pesada tipo hTINAl-H2".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hTINAl-H2 es descrita en la SEQ ID NO: 14 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste de los residuos de 20 aminoácidos 1 al 19, una secuencia que consiste de los residuos de aminoácidos 20 al 140, y una secuencia que consiste de los residuos de aminoácidos 141 al 470 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, corresponden a la secuencia de señal, la región variable de cadena pesada, y 25 la región constante de cadena pesada, respectivamente. La

secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 es descrita en la SEQ ID NO: 13 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste de los nucleótidos 1 al 57, una secuencia que consiste de los nucleótidos 58 al 420, y una secuencia que consiste de los nucleótidos 421 al 1410 en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 13 codifican la secuencia de señal, la secuencia de la región variable de cadena pesada, y la secuencia de la región constante de cadena pesada, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 13 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 son también descritas en la Figura 4.

6-2-3) Cadena pesada tipo hTINA1-H3

Una cadena pesada TINA1 humanizada diseñada por el involucramiento del remplazo de la posición del aminoácido 28 (prolina) con alanina, posición del aminoácido 30 (leucina) con valina, posición del aminoácido 36 (treonina) con serina, posición del aminoácido 38 (arginina) con lisina, posición del aminoácido 39 (isoleucina) con valina, posición del aminoácido 58 (lisina) con glutamina, posición del aminoácido 65 (lisina) con ácido glutámico, posición del aminoácido 67 (isoleucina) con metionina, posición del aminoácido 87 (fenilalanina) con valina, posición del aminoácido 88 (alanina) con treonina, posición del aminoácido 92 (ácido glutámico) con ácido aspártico, posición del aminoácido 95

(alanina) con treonina, posición del aminoácido 102
 (isoleucina) con leucina, posición del aminoácido 104
 (asparagina) con serina, posición del aminoácido 107
 (asparagina) con serina, posición del aminoácido 111
 5 (treonina) con alanina, posición del aminoácido 112
 (treonina) con valina, posición del aminoácido 114
 (fenilalanina) con tirosina, posición del aminoácido 132
 (alanina) con glutamina, y la posición del aminoácido 135
 (alanina) con leucina respecto a la cadena pesada TINA1
 10 mostrada en la SEQ ID NO: 8 del Listado de Secuencias, fue
 designada como "cadena pesada tipo hTINA1-H3".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada
 tipo hTINA1-H3 es descrita en la SEQ ID NO: 16 del Listado de
 Secuencias. Una secuencia que consiste de los residuos de
 15 aminoácidos 1 al 19, una secuencia que consiste de los
 residuos de aminoácidos 20 al 140, y una secuencia que
 consiste de los residuos de aminoácidos 141 al 470 en la
 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, corresponden a
 la secuencia de señal, la región variable de cadena pesada, y
 20 la región constante de cadena pesada, respectivamente. La
 secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de
 aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 es descrita en la SEQ ID NO:
 15 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste de
 los nucleótidos 1 al 57, una secuencia que consiste de los
 25 nucleótidos 58 al 420, y una secuencia que consiste de los

nucleótidos 421 al 1410 en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 15 codifican la secuencia de señal, la secuencia de la región variable de cadena pesada, y la secuencia de la región constante de cadena pesada, respectivamente. Las 5 secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 15 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 son también descritas en la Figura 5.

6-3) Humanización de la cadena ligera TINA1

6-3-1 Cadena ligera tipo HTINA1-L1:

10 Una cadena ligera de TINA1 humanizada, diseñada por el involucramiento del remplazo de la posición del aminoácido 23 (valina) con glutamina, posición del aminoácido 28 (histidina) con prolina, posición del aminoácido 29 (lisina) con serina, posición del aminoácido 30 (fenilalanina) con 15 serina, posición del aminoácido 31 (metionina) con leucina, posición del aminoácido 33 (treonina) con alanina, posición del aminoácido 40 (serina) con treonina, posición del aminoácido 62 (glutamina) con lisina, posición del aminoácido 63 (serina) con alanina, posición del aminoácido 80 (ácido 20 aspártico) con serina, posición del aminoácido 83 (treonina) con serina, posición del aminoácido 90 (alanina) con ácido aspártico, posición del aminoácido 93 (fenilalanina) con leucina, posición del aminoácido 98 (valina) con leucina, posición del aminoácido 100 (alanina) con prolina, posición 25 del aminoácido 103 (leucina) con fenilalanina, posición del

aminoácido 120 (alanina) con glutamina, posición del aminoácido 126 (leucina) con isoleucina, y la posición del aminoácido 129 (alanina) con treonina respecto a la cadena ligera de TINA1 mostrada en la SEQ ID NO: 10 del Listado de Secuencias, fue designada como "cadena ligera tipo hTINA1-L1".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo hTINA1-L1 es descrita en la SEQ ID NO: 18 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste de los residuos de aminoácidos 1 al 20, una secuencia que consiste de los residuos de aminoácidos 21 al 129, y una secuencia que consiste de los residuos de aminoácidos 130 al 234 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, corresponden a la secuencia de señal, la región variable de cadena ligera, y la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 es descrita en la SEQ ID NO: 17 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste de los nucleótidos 1 al 60, una secuencia que consiste de los nucleótidos 61 al 387, y una secuencia que consiste de los nucleótidos 388 al 702 en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17 codifican la secuencia de señal, la secuencia de la región variable de cadena ligera, y la secuencia de la región constante de cadena ligera, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17 y la secuencia

de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 son también descritas en la Figura 6.

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

Una cadena ligera de TINA1 humanizada diseñada por el involucramiento el remplazo de la posición del aminoácido 28 (histidina) con prolina, la composición del aminoácido 29 (lisina) con serina, posición del aminoácido 30 (fenilalanina) con serina, posición del aminoácido 31 (metionina) con leucina, posición del aminoácido 33 (treonina) con alanina, posición del aminoácido 40 (serina) con treonina, posición del aminoácido 62 (glutamina) con lisina, posición del aminoácido 63 (serina) con alanina, posición del aminoácido 80 (ácido aspártico) con serina, posición del aminoácido 83 (treonina) con serina, posición del aminoácido 90 (alanina) con ácido aspártico, posición del aminoácido 93 (fenilalanina) con leucina, posición del aminoácido 98 (valina) con leucina, posición del aminoácido 100 (alanina) con prolina, posición del aminoácido 103 (leucina) con fenilalanina, posición del aminoácido 120 (alanina) con glutamina, posición del aminoácido 126 (leucina) con isoleucina, y posición del aminoácido 129 (alanina) con treonina respecto a la cadena ligera de TINA1 mostrada en la SEQ ID NO: 10 del Listado de Secuencias, fue designada como un "cadena ligera tipo hTINA1-L2".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera

tipo hTINA1-L2 es descrita en la SEQ ID NO: 20 del Listado de
 Secuencias. Una secuencia que consiste de los residuos de
 aminoácidos 1 al 20, una secuencia que consiste de los
 residuos de aminoácidos 21 al 129, y una secuencia que
 5 consiste de los residuos de aminoácidos 130 al 234 en la
 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 corresponden a
 la secuencia de señal, la región variable de cadena ligera, y
 la región constante de cadena ligera, respectivamente. La
 secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de
 10 aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 es descrita en la SEQ ID NO.
 19 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste de
 los nucleótidos 1 al 60, una secuencia que consiste de los
 nucleótidos 61 al 387, y una secuencia que consiste de los
 nucleótidos 388 al 702 en la secuencia nucleotídica de la SEQ
 15 ID NO: 19, codifican la secuencia de señal, la secuencia de
 la región variable de cadena ligera, y la secuencia de la
 región constante de cadena ligera, respectivamente. La
 secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 19 y la secuencia de
 aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 son también descritas en la
 20 Figura 7.

6-3-3) Cadena ligera tipo hTINA1-L3:

Una cadena ligera TINA1 humanizada, diseñada
 mediante el involucramiento del remplazo de la posición del
 aminoácido 28 (histidina) con prolina, posición del
 25 aminoácido 29 (lisina) con serina, posición del aminoácido 30

(fenilalanina) con serina, posición del aminoácido 31
 (metionina) con leucina, posición del aminoácido 33
 (treonina) con alanina, posición del aminoácido 40 (serina)
 con treonina, posición del aminoácido 62 (glutamina) con
 5 lisina, posición del aminoácido 63 (serina) con glutamina,
 posición del aminoácido 80 (ácido aspártico) con serina,
 posición del aminoácido 83 (treonina) con serina, posición
 del aminoácido 90 (alanina) con ácido aspártico, posición del
 aminoácido 93 (fenilalanina) con leucina, posición del
 10 aminoácido 98 (valina) con leucina, posición del aminoácido
 100 (alanina) con prolina, posición del aminoácido 103
 (leucina) con fenilalanina, posición del aminoácido 120
 (alanina) con glutamina, posición del aminoácido 126
 (leucina) con isoleucina, y posición del aminoácido 129
 15 (alanina) con treonina respecto a la cadena ligera de TINA1
 mostrada en la SEQ ID NO: 10 del listado de secuencias, fue
 designada como una "cadena ligera tipo hTINA1-L3".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera
 tipo hTINA1-L3 es descrita en la SEQ ID NO: 22 del Listado de
 20 Secuencias. Una secuencia que consiste de los residuos de
 aminoácidos 1 al 20, una secuencia que consiste de los
 residuos de aminoácidos 21 al 129, y una secuencia que
 consiste de los residuos de aminoácidos 130 a 234 en la
 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 corresponden a
 25 la secuencia de señal, la región variable de cadena ligera, y

la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 es descrita en la SEQ ID NO: 21 del Listado de Secuencias. Una secuencia que consiste de los nucleótidos 1 al 60, una secuencia que consiste de los nucleótidos 61 al 387, y una secuencia que consiste de los nucleótidos 388 al 702 en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 21 codifican la secuencia de señal, la secuencia de la región variable de cadena ligera, y la secuencia de la región constante de cadena ligera, respectivamente. La secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 21 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 son también descritas en la Figura 8.

Ejemplo 7: Construcción del vector de expresión del anticuerpo hTINA1 y producción del anticuerpo

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

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

Un fragmento de ADN que contiene la secuencia de ADN que codifica la región variable hTINA1-H1, mostrado en las posiciones de los nucleótidos 36 al 437 de la secuencia de nucleótidos de hTINA1-H1, representado por la SEQ ID NO: 11 del Listado de Secuencias, fue sintetizado (Servicio de Síntesis de Genes Artificiales GeneArt). Un fragmento de ADN que contiene la secuencia de ADN que codifica la región

variable de hTINA-H1 fue amplificado utilizando el fragmento de AND sintetizado, como una plantilla, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.), y un grupo de cebadores descrito más adelante, e insertado a un sitio escindido con la enzima de restricción BlnI del vector de expresión pCMA-G1 de cadena pesada tipo IgG1, quimérico y humanizado, utilizando un kit de clonación por PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión hTINA1-H1. El vector de expresión obtenido fue designado como "pCMA-G1/hTINA1-H1".

10 Primer grupo

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

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

15 7-1-2) Construcción del vector de expresión hTINA1-H2

Un fragmento de ADN que contiene la secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-H2 mostrada en las posiciones de nucleótidos 36 al 437 de la secuencia nucleotídica de hTINA1-H2 representada por la SEQ ID NO: 13 del Listado de Secuencias, fue sintetizado (servicio de Síntesis de Genes Artificiales GeneArt), y un vector de expresión hTINA1-H2 fue construido de la misma manera que en el Ejemplo 7-1-1). El vector de expresión obtenido fue designado como "pCMA-G1/hTINA1-H2".

7-1-3) Construcción del vector de expresión hTINA1-H3

Un fragmento de ADN que contiene la secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-H3 mostrada en las posiciones de nucleótidos 36 al 437 de la secuencia de nucleótidos de hTINA1-H3 representada por la SEQ ID NO: 15 del Listado de Secuencias, fue sintetizado (servicio de Síntesis de Genes Artificiales GeneArt), y un vector de expresión hTINA1-H3 fue construido de la misma manera que en el Ejemplo 7-1-1). El vector de expresión obtenido fue designado como "pCMA-G1/hTINA1-H3".

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

7-2-1) Construcción del vector de expresión hTINA1-L1

Un fragmento de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-L1, mostrado en las posiciones de los nucleótidos 38 al 402 de la secuencia nucleotídica de hTINA1-L1 representada por la SEQ ID NO: 17 del Listado de Secuencias, fue sintetizado (servicio de Síntesis de Genes Artificiales GeneArt). Un fragmento de ADN que contiene la secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-L1, fue amplificado utilizando el fragmento de ADN sintetizado, como una plantilla, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.), y un grupo de cebadores descrito más adelante, e insertado a un sitio escindido con la enzima de restricción BsiW1 del vector de expresión de cadena ligera

del anticuerpo quimérico y humanizado, pCMA-LK, utilizando el kit de clonación por PCR In-Fusion Hd (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión hTINA1-L1. El vector de expresión obtenido fue designado como "pCMA-LK/hTINA1-L1".

Primer grupo

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

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

7-2-2) Construcción del vector de expresión hTINA1-L2

Un fragmento de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-L2, mostrado en las posiciones de los nucleótidos 38 al 402 de la secuencia nucleotídica de hTINA1-L2 representada por la SEQ ID NO: 19 del Listado de Secuencias, fue sintetizado (servicio de Síntesis de Genes Artificiales GeneArt), y un vector de expresión hTINA1-L2 fue construido de la misma manera que en el Ejemplo 7-2-1). El vector de expresión obtenido fue designado como "pCMA-LK/hTINA1-L2".

7-2-3) Construcción del vector de expresión hTINA1-L3

Un fragmento de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica la región variable de hTINA1-L3, mostrado en las posiciones de los nucleótidos 38 al 402 de la secuencia nucleotídica de hTINA1-L3 representada por la SEQ ID NO: 21

del Listado de Secuencias, fue sintetizado (servicio de Síntesis de Genes Artificiales GeneArt), y un vector de expresión hTINA1-L3 fue construido de la misma manera que en el Ejemplo 7-2-1). El vector de expresión obtenido fue
 5 designado como "pCMA-LK/hTINA1-L3".

7-3) Producción y purificación del anticuerpo hTINA1

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

Cada anticuerpo fue producido de la misma manera que en el Ejemplo 5-2-5).

10 El anticuerpo hTINA1 obtenido por la combinación de pCMA-G1/hTINA1-H1 y pCMA-LK/hTINA1-L1 fue designado como "hTINA1-H1L1"; el anticuerpo hTINA1 obtenido por la combinación de pCMA-G1/hTINA1-H2 y pCMA-LK/hTINA1-L1 fue designado como "hTINA1-H2L1"; el anticuerpo hTINA1 obtenido
 15 por la combinación de pCMA-G1/hTINA1-H2 y pCMA-LK/hTINA1-L2 fue designado como "hTINA1-H2L2"; y el anticuerpo hTINA1 obtenido por la combinación de pCMA-G1/hTINA1-H3 y pCMA-LK/hTINA1-L3 fue designado como "hTINA1-H3L3".

7-3-2) Producción del anticuerpo hTINA1

20 hTINA1-H1-L1, hTINA1-H2L1, hTINA1-H2L2 y hTINA1-H3L3 fueron producidos mediante el siguiente método.

Células FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) fueron subcultivadas y cultivadas de acuerdo al manual. 1.2×10^9 células FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) en la fase de
 25 crecimiento logarítmico fueron sembradas en un Matraz

Erlenmeyer Fernbach de 3 Litros (Corning Inc.), luego diluidas con un medio de expresión de FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.) hasta 1.0×10^6 células/ml, y luego cultivadas con agitación a 90 rpm por 1 hora en una incubadora de 8 % de CO₂ a 37°C. La polietilenimina (Polyscience #24765; 3.6 mg) fue disuelta en Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 20 ml). Luego, el vector de expresión de cadena ligera (0.8 mg) y el vector de expresión de cadena pesada (0.4 mg) preparados utilizando el kit del Plásmido PureLink HiPure (Invitrogen Corp.) fueron agregados al Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 20 ml). La solución mixta de vector de expresión/Opti-Pro SFM (20 ml) fue agregada a la solución mixta de polietilenimina/Opti-Pro SFM (20 ml), y la mezcla fue suavemente agitada, posteriormente dejada por 5 minutos, y luego agregada a las células FreeStyle 293F. Un sobrenadante de cultivo obtenido mediante el cultivo en agitación a 90 rpm por 7 días en una incubadora de 8 % de CO₂ a 37°C, fue filtrada a través del Filtro de Cápsula Desechable (ADVANTEC #CC-045-E1H).

20 7-3-3) Purificación del anticuerpo hTINA1

Cada anticuerpo fue purificado a partir del sobrenadante de cultivo obtenido en el inciso 7-3-2) anterior mediante dos pasos utilizando la cromatografía de afinidad rProtein A (4 a 6°C) e hidroxapatita de cerámica (temperatura ambiente). Los pasos de remplazo del

amortiguador después de la purificación por cromatografía de afinidad de rProtein A y después de la purificación con hidroxapatita de cerámica fueron llevados a cabo a 4 - 6°C. Primeramente, el sobrenadante de cultivo fue aplicado al

5 MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Japan Corporation, columna HiTrap) equilibrada con PBS. Después de la entrada del sobrenadante de cultivo completo en la columna, la columna fue lavada con PBS en una cantidad al menos dos veces el volumen de la columna. Enseguida, las

10 fracciones que contenían el anticuerpo fueron recolectadas mediante elución con solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4.0). Las fracciones fueron remplazadas de amortiguador con PBS mediante diálisis (Thermo Fisher Scientific, Inc., un Casete de Diálisis Slide-A-Lyzer) y luego diluidas 5 veces

15 con un amortiguador de fosfato de sodio 5 mM y MES 50 mM (pH 7.0). La solución de anticuerpo resultante fue aplicada a una columna de hidroxapatita de cerámica (Bio-Rad Laboratories, Inc., Columna de Hidroxapatita Tipo I Bio-Scale CHT) equilibrada con un amortiguador de NaPi 5 mM, MES 50 mM, y

20 NaCl 30 mM (pH 7.0). Las fracciones que contenían el anticuerpo fueron recolectadas mediante elución en gradiente de concentración lineal utilizando cloruro de sodio. Las fracciones fueron remplazadas en amortiguador con HBSor (histidina 25 mM/5 % de sorbitol, pH 6.0) mediante diálisis

25 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Casete de Diálisis Slide-A-

Lyzer). Finalmente, las fracciones fueron concentradas y ajustadas a una concentración de IgG de 20 mg/ml o mayor utilizando un dispositivo de Filtro Centrífugo de UF VIVASPIN 20 (corte de peso molecular: UF10K, Santorius AG, 4°C), y
5 utilizadas como una muestra purificada.

Ejemplo de Referencia 1: Producción del vector de expresión del anticuerpo hRS7 y producción del anticuerpo

El anticuerpo hRS7 fue producido con base en las secuencias de aminoácidos de una cadena ligera y una cadena
10 pesada descrita en la Publicación Internacional No. WO 2003/074566.

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

Un fragmento de ADN que contenía una secuencia de
15 ADN que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo hRS7, mostrado en las posiciones de nucleótidos 36 a 437 de la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo hRS7 representada por la SEQ ID NO: 29 del Listado de Secuencias, fue sintetizado (servicio de Síntesis de Genes
20 Artificiales GeneArt), y un vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo hRS7 fue construido de la misma manera que en el Ejemplo 7-1-1). El vector de expresión obtenido fue designado como "pCM-G1/hRS7". La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo hRS7 es mostrada en la SEQ ID
25 NO: 30 del Listado de Secuencias.

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

Un fragmento de ADN que contenía una secuencia de ADN que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo hRS7, mostrado en las posiciones de nucleótidos 38 a 402 de la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo hRS7 representada por la SEQ ID NO: 31 del Listado de Secuencias, fue sintetizado (servicio de Síntesis de Genes Artificiales GeneArt), y un vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo hRS7 fue construido de la misma manera que en el Ejemplo 7-2-1). El vector de expresión obtenido fue designado como "pCMA-LK/hRS7". La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo hRS7 es mostrada en la SEQ ID NO: 32 del Listado de Secuencias.

15 1-3) Producción y purificación del anticuerpo hRS7

1-3-1) Producción del anticuerpo hRS7

El anticuerpo hRS7 fue producido de la misma manera que en el Ejemplo 7-3-2) por la combinación de pCMA G1/hRS7 y pCMA-LK/hRS7.

20 1-3-2) Purificación del anticuerpo hRS7

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

Ejemplo 8: Medición de la afinidad de enlace al antígeno del anticuerpo hTINA1 y el anticuerpo hRS7

8-1) Medición de la afinidad de enlace al antígeno utilizando el anticuerpo (sobrenadante de cultivo) producido a pequeña escala

Cada anticuerpo fue evaluado para su constante de disociación para un antígeno (Quimera Humana Recombinante TROP-2 Fc) utilizando Biacore 3000 (GE Healthcare Japan Corporation) mediante el método de captura para capturar el anticuerpo como un ligando sobre un anticuerpo anti-IgG humano (Fab) inmovilizado, y evaluando el antígeno como un analito. Aproximadamente 2000 RU del anticuerpo anti-IgG humano (Fab) (kit de captura de Fab Humano, GE Healthcare Japan Corporation) fue covalentemente enlazado a un chip sensor CM5 (BIAcore, Inc.) mediante el método de acoplamiento de amina. Similarmente, este anticuerpo fue inmovilizado sobre una celda de flujo de referencia. El amortiguador de corrimiento utilizado fue HBS-EP+ (HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM, 0.05 % de Tensioactivo P20). El sobrenadante de cultivo que contenía el anticuerpo fue agregado por 80 segundos sobre el chip inmovilizado con el anticuerpo anti-IgG humano (Fab) y luego, las diluciones en serie (1 hasta 1000 nM) del antígeno fueron cada una agregadas a una velocidad de flujo de 30 μ l/minuto por 300 segundos. Subsecuentemente, la fase de disociación fue monitorizada por 600 segundos. Gly-HCl 10 mM (pH 1.5) que contenía 20 % de DMSO fue agregado a ésta como una solución

de regeneración a una velocidad de flujo de 10 μl /minuto por 60 segundos. Los datos fueron analizados utilizando el modelo de enlace Bivalente del software analítico (software BIAevaluación, versión 4.1) para calcular una constante de velocidad de asociación k_{on} , una constante de velocidad de disociación k_{off} , y una constante de disociación (K_D ; $K_D = k_{off}/k_{on}$).

Tabla 1

	Nombre	K_D (M)
1	hTINA1-H1L1	6.3E-08
2	hTINA1-H2L1	6.9E-08
3	hTINA1-H2L2	7.1E-08
4	hTINA1-H3L3	5.8E-08
5	cTINA1	5.6E-08

Actividad de enlace utilizando el sobrenadante de cultivo como muestra de anticuerpo

8-2) Medición de la afinidad de enlace al antígeno utilizando el anticuerpo purificado

Cada anticuerpo fue evaluado para su constante de disociación para un antígeno (Quimera Recombinante Humana TROP-2 Fc) utilizando Biacore 3000 (GE Healthcare Japan Corporation) mediante el método de captura para capturar el anticuerpo como un ligando sobre un anticuerpo anti-IgG humano (Fab) inmovilizado, y evaluando el antígeno como un

analito. Aproximadamente 2000 RU del anticuerpo anti-IgG humano (Fab) (kit de captura de Fab Humano, GE Healthcare Japan Corporation) fue covalentemente enlazado a un chip sensor CM5 (BIAcore, Inc.) mediante el método de acoplamiento de amina. Similarmente, este anticuerpo fue inmovilizado sobre una celda de flujo de referencia. El amortiguador de corrimiento utilizado fue HBS-EP+ (HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM, 0.05 % de Tensioactivo P20). El anticuerpo fue agregado por 1 minuto sobre el chip inmovilizado con el anticuerpo anti-IgG humano (Fab) y luego, las diluciones en serie (1 hasta 1000 nM) del antígeno fueron cada una agregadas a ésta a una velocidad de flujo de 30 μ l/min por 300 segundos. Subsecuentemente, la fase de disociación fue monitorizada por 600 segundos. NaOH 25 mM diluido con un amortiguador de corrimiento fue agregado dos veces a ésta como una solución de regeneración a una velocidad de flujo de 100 μ l/minuto por 3 segundos. Los datos fueron analizados de la misma manera que se describe anteriormente.

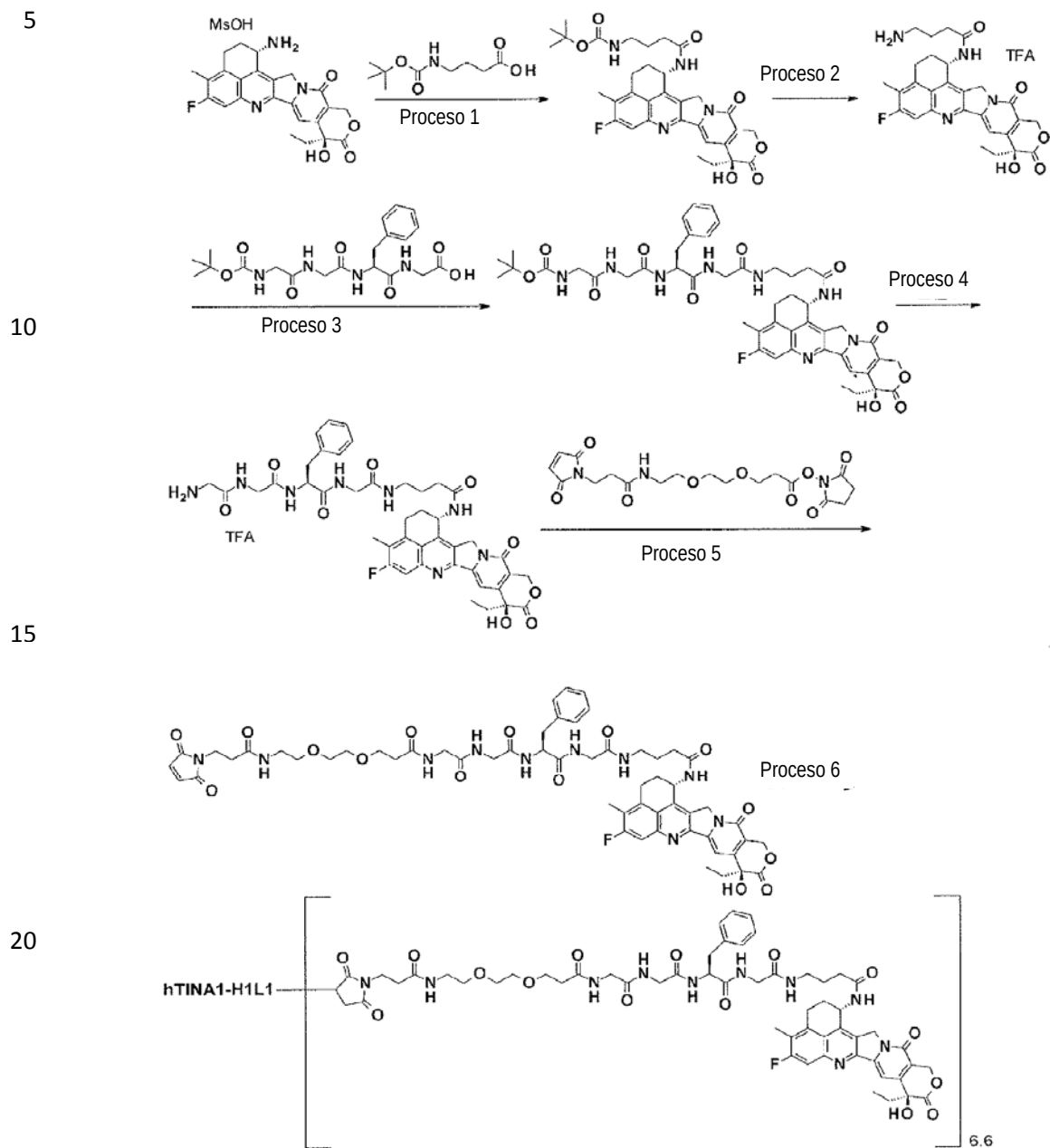
Tabla 2

	Nombre	KD (M)
1	hTINA1-H1L1	2.7E-08
2	hTINA1-H2L1	3.0E-08
3	hTINA1-H2L2	2.7E-08
4	hTINA1-H3L3	1.5E-08
5	hRS7	3.0E-10

Medición de la actividad de enlace utilizando el anticuerpo purificado como muestra de anticuerpo

Ejemplo 9: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (1)

Fórmula 25



Proceso 1: 4-[[[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-

hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-4-oxobutil)carbamato de terc-Butilo

El ácido 4-(tert-Butoxicarbonilamino)butanoico
 5 (0.237 g, 1.13 mmol) fue disuelto en diclorometano (10 ml), y se agregaron N-hidroxisuccinimida (0.130 g, 1.13 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, (0.216 g, 1.13 mmol) y se agitó por 1 hora. La solución de reacción fue agregada gota a gota a una solución de N,N-
 10 dimetilformamida (10 ml) cargada con mesilato de exatecán (0.500 g, 0.94 mmol) y trietilamina (0.157 ml, 1.13 mmol), y agitada a temperatura ambiente por 1 día. El solvente fue eliminado bajo presión reducida y el residuo obtenido fue purificado mediante cromatografía en columna sobre gel de
 15 sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 8 : 2 (v/v)] para producir el compuesto del título (0.595 g, cuantitativo).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.87 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.31 (9H, s), 1.58 (1H, t, J=7.2 Hz), 1.66 (2H, t, J=7.2 Hz), 1.89-1.82 (2H, m), 2.12-2.21 (3H, m), 2.39 (3H, s), 2.92 (2H,
 20 t, J=6.5 Hz), 3.17 (2H, s), 5.16 (1H, d, J=19.2 Hz), 5.24 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.42 (2H, s), 5.59-5.55 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.78 (1H, t, J=6.3 Hz), 7.30 (1H, s), 7.79 (1H, d, J=11.0 Hz), 8.40 (1H, d, J=8.6 Hz).

MS (APCI) m/z: 621 (M+H)⁺.

25 Proceso 2: Trifluoroacetato de 4-Amino-N-[(1S,9S)-

9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]butanamida

El compuesto (0.388 g, 0.61 mmol) obtenido en el
 5 Proceso 1 anterior fue disuelto en diclorometano (9 ml). Se
 agregó ácido trifluoroacético (9 ml) y éste se agitó por 4
 horas. El solvente fue eliminado bajo presión reducida, y los
 residuos obtenidos fueron purificados mediante cromatografía
 en columna sobre gel de sílice [cloroformo - capa orgánica
 10 dividida de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)]
 para producir el compuesto del título (0.343 g,
 cuantitativo).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.87 (3H, t, J=7.2 Hz),
 1.79-1.92 (4H, m), 2.10-2.17 (2H, m), 2.27 (2H, t, J=7.0 Hz),
 15 2.40 (3H, s), 2.80-2.86 (2H, m), 3.15-3.20 (2H, m), 5.15 (1H,
 d, J=18.8 Hz), 5.26 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.42 (2H, s), 5.54-
 5.61 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.32 (1H, s), 7.72 (3H, s
 amplio), 7.82 (1H, d, J=11.0 Hz), 8.54 (1H, d, J=8.6 Hz).

MS (APCI) m/z: 521 (M+H)⁺.

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

25 La N-(terc-Butoxicarbonil)glicilglicil-L-

fenilalanilglicina (0.081 g, 0.19 mmol) fue disuelta en diclorometano (3 ml), y se agregaron N-hidroxisuccinimida (0.021 g, 0.19 mol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0.036 g, 0.19 mmol) y luego
 5 se agitaron por 3.5 horas. La solución de reacción se agregó gota a gota a una solución de N,N-dimetilformamida (1.5 ml) cargada con el compuesto (0.080 g, 0.15 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior, y se agitó a temperatura ambiente por 4 horas. El solvente fue eliminado bajo presión reducida y los
 10 residuos obtenidos fueron purificados mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - cloroformo : metanol = 8 : 2 (v/v)] para producir el compuesto del título (0.106 g, 73 %).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.87 (3H, t, J=7.4 Hz),
 15 1.36 (9H, s), 1.71 (2H, m), 1.86 (2H, t, J=7.8 Hz), 2.15-2.19 (4H, m), 2.40 (3H, s), 2.77 (1H, dd, J=12.7, 8.8 Hz), 3.02 (1H, dd, J=14.1, 4.7 Hz), 3.08-3.11 (2H, m), 3.16-3.19 (2H, m), 3.54 (2H, d, J=5.9 Hz), 3.57-3.77 (4H, m), 4.46-4.48 (1H, m), 5.16 (1H, d, J=19.2 Hz), 5.25 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.42
 20 (2H, s), 5.55-5.60 (1H, m), 6.53 (1H, s), 7.00 (1H, t, J=6.3 Hz), 7.17-7.26 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.71 (1H, t, J=5.7 Hz), 7.80 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.92 (1H, t, J=5.7 Hz), 8.15 (1H, d, J=8.2 Hz), 8.27 (1H, t, J=5.5 Hz), 8.46 (1H, d, J=8.2 Hz).

MS (APCI) m/z: 939 (M+H)⁺.

25 Proceso 4: Trifluoroacetato de glicilglicil-L-

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

5 El compuesto (1.97 g, 2.10 mmol) obtenido en el Proceso 3 anterior fue disuelto en diclorometano (7 ml). Después de agregar el ácido trifluoroacético (7 ml), éste se agitó por 1 hora. El solvente se eliminó bajo presión reducida, y se cargó con tolueno para la destilación azeotrópica. Los residuos obtenidos fueron purificados mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - capa orgánica dividida de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título (1.97 g, 99 %).

15 RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.87 (3H, t, J=7.4 Hz), 1.71-1.73 (2H, m), 1.82-1.90 (2H, m), 2.12-2.20 (4H, m), 2.40 (3H, s), 2.75 (1H, dd, J=13.7, 9.4 Hz), 3.03-3.09 (3H, m), 3.18-3.19 (2H, m), 3.58-3.60 (2H, m), 3.64 (1H, d, J=5.9 Hz), 3.69 (1H, d, J=5.9 Hz), 3.72 (1H, d, J=5.5 Hz), 3.87 (1H, dd, J=16.8, 5.9 Hz), 4.50-4.56 (1H, m), 5.16 (1H, d, J=19.2 Hz), 5.25 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.42 (2H, s), 5.55-5.60 (1H, m), 7.17-7.27 (5H, m), 7.32 (1H, s), 7.78-7.81 (2H, m), 7.95-7.97 (3H, m), 8.33-8.35 (2H, m), 8.48-8.51 (2H, m).

MS (APCI) m/z: 839 (M+H)⁺.

25 Proceso 5: N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-

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

A una solución en N,N-dimetilformamida (1.20 ml)
 del compuesto (100 mg, 0.119 mmol) obtenido en el Proceso 4
 anterior, se agregaron diisopropiletilamina (20.8 µl, 0.119
 10 mmol) y 3-(2-(2-(3-
 maleinimidopropanamida)etoxi)etoxi)propanoato de N-
 succinimidilo (50.7 mg, 0.119 mmol) y se agitaron a
 temperatura ambiente por 1 hora. El solvente se eliminó bajo
 presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron
 15 mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice
 [cloroformo - cloroformo : metanol = 5 : 1 (v/v)] para
 producir el compuesto del título como un sólido amarillo
 pálido (66.5 mg, 48 %).

NMR-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.85 (3H, t, J = 7.4
 20 Hz), 1.65-1.74 (2H, m), 1.77-1.90 (2H, m), 2.07-2.19 (4H, m),
 2.30 (2H, t, J = 7.2 Hz), 2.33-2.36 (2H, m), 2.38 (3H, s),
 2.76 (1H, dd, J = 13.7, 9.8 Hz), 2.96-3.18 (9H, m), 3.42-3.44
 (4H, m), 3.53-3.76 (10H, m), 4.43 (1H, td, J = 8.6, 4.7 Hz),
 5.14 (1H, d, J = 18.8 Hz), 5.23 (1H, d, J = 18.8 Hz), 5.38
 25 (1H, d, J = 17.2 Hz), 5.42 (1H, d, J = 17.2 Hz), 5.52-5.58

(1H, m), 6.52 (1H, s), 6.98 (2H, s), 7.12-7.17 (1H, m), 7.18-7.25 (4H, m), 7.29 (1H, s), 7.69 (1H, t, J = 5.5 Hz), 7.78 (1H, d, J = 11.3 Hz), 7.98-8.03 (2H, m), 8.11 (1H, d, J = 7.8 Hz), 8.16 (1H, t, J = 5.7 Hz), 8.23 (1H, t, J = 5.9 Hz), 8.44
 5 (1H, d, J = 9.0 Hz).

MS (APCI) m/z: 1149 (M+H)⁺.

Proceso 6: Conjugado anticuerpo-fármaco (1)

Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 fue preparado para tener la concentración del
 10 anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento Común B (fue utilizado como el coeficiente de absorción a 280 nm, 1.54) y el Procedimiento Común C descrito en el Método de producción 1. La solución (10.0 ml)fue recolectada dentro de un tubo de 50 ml y cargada con una
 15 solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.317 ml; 4.6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de fosfato ácido dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0.500 ml). Después de confirmar que la solución tenía pH de 7.4 ± 0.1 , el enlace disulfuro en la
 20 parte de bisagra del anticuerpo fue reducida por incubación a 37°C por 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y el ligador fármaco: Después de incubar la solución anterior por 10 minutos en un baño de agua a temperatura ambiente, se agregó
 25 a ésta sulfóxido de dimetilo (0.567 ml). Subsecuentemente, se

agregó a ésta una solución de sulfóxido de dimetilo que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 5 anterior (0.635 ml; 9.2 equivalentes por molécula de anticuerpo) y se agitó mediante el uso de un rotador tubular 5 (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) para la conjugación del ligador de fármaco al anticuerpo a temperatura ambiente por 40 minutos. Enseguida, se agregó a ésta una solución acuosa (0.127 ml; 18.4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) 10 y se agitó para terminar la reacción del ligador de fármaco a temperatura ambiente por otros 20 minutos.

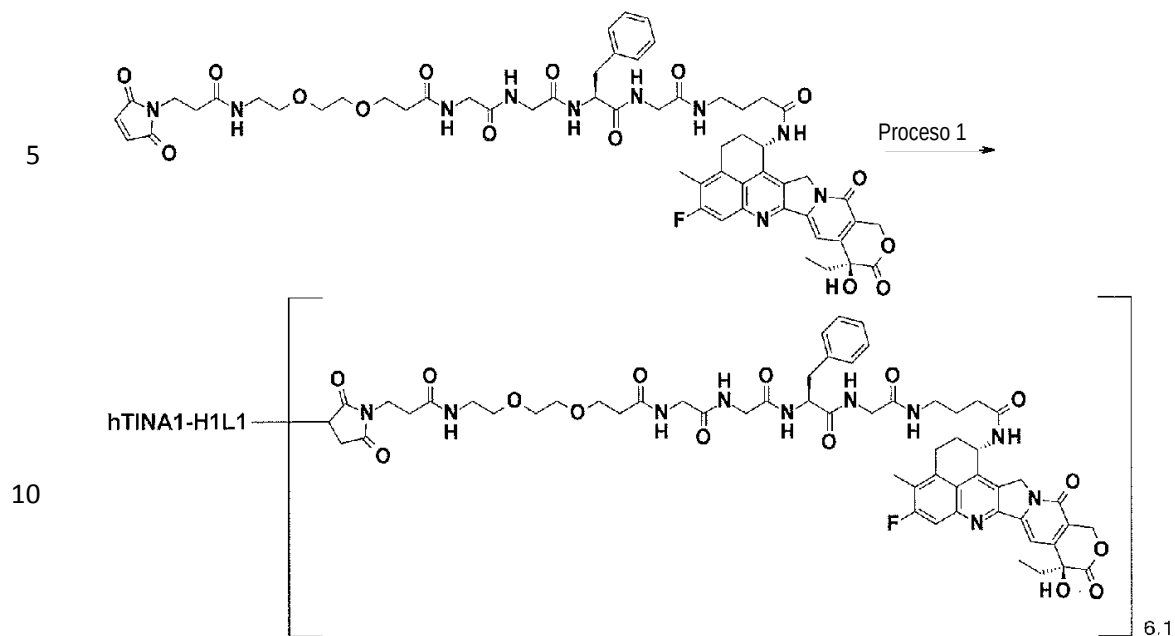
Purificación: La solución anterior fue sometida a purificación utilizando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1 para producir 35.0 ml de una 15 solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento E común descrito en el Método de producción 1 ($\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor promedio medido), y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor 20 promedio medido) fueron utilizados), fueron obtenidos los siguientes valores característicos.

Concentración del anticuerpo: 2.70 mg/ml, rendimiento del anticuerpo: 94.5 mg (95 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de 25 anticuerpo, medido mediante Procedimiento Común E: 6.6.

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

Fórmula 26

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (2)

15 Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 fue preparado para tener la concentración del anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (como el coeficiente de absorción a 280 nm, 1.54 fue utilizado) y el Procedimiento común C descrito

20 en el Método de producción 1. La solución (2.00 ml) fue recolectada mediante un tubo de 4 ml y cargada con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.0690 ml; 5.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de fosfato ácido dipotásico

25 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0.100 ml). Después de confirmar

que la solución tenía pH de 7.4 ± 0.1 , el enlace disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo fue reducido mediante la incubación a 37°C por 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y el ligador de fármaco: Después de incubar la solución anterior por 10 minutos en un baño de agua a 15°C , se agregó a ésta una solución de sulfóxido de dimetilo (0.127 ml; 9.2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 5 del Ejemplo 9, y se incubó para la conjugación del ligador de fármaco al anticuerpo en el baño de agua de 15°C por 1 hora. Enseguida, se agregó a ésta una solución acuosa (0.0190 ml; 13.8 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) y se agitó mediante el uso de un rotador tubular para terminar la reacción del ligador de fármaco a temperatura ambiente por 20 minutos.

Purificación: La solución anterior fue sometida a purificación utilizando el Procedimiento común D, descrito en el Método de purificación 1, para producir 9.00 ml de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco del título.

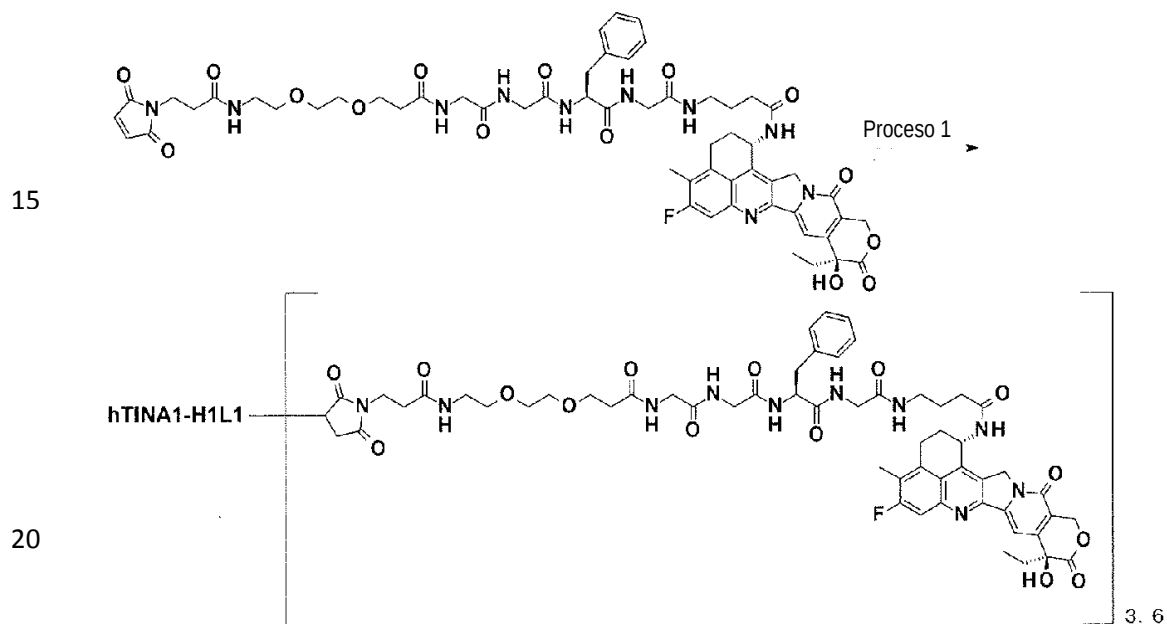
Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento común E descrito en el Método

de producción 1 ($\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor promedio medido),
y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor promedio medido), fueron
utilizados), se obtuvieron los siguientes valores
característicos.

5 Concentración del anticuerpo: 2.08 mg/ml,
rendimiento del anticuerpo: 18.7 mg (94 %), y número
promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por
molécula de anticuerpo, medidas mediante el
Procedimiento común E: 6.1.

10 **Ejemplo 11: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (3)**

Fórmula 27



Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (3)

Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1

producido en el Ejemplo 7 fue preparado para tener la concentración del anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (como el coeficiente de absorción a 280 nm, 1.54 fue
5 utilizado) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (5.00 ml) fue recolectada dentro de un recipiente de 15 ml, cargado con una solución acuosa de fosfato ácido dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0.0813 ml) con agitación, y
10 luego se agitó a 37°C por 10 minutos. Después de agregar a ésta una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.0745 ml; 2.3 equivalentes por molécula de anticuerpo) con agitación, y luego la confirmación de que la solución
15 tenía pH de 7.0 ± 0.1 , el enlace disulfuro en la parte de bisagra del anticuerpo fue reducido mediante agitación a 37°C por 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y el ligador de fármaco: Después de agitar la solución anterior
20 por 10 minutos en un baño de agua de 15°C, se agregó gradualmente a ésta gota a gota, una solución en sulfóxido de dimetilo (0.162 ml; 5.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 5 del Ejemplo 9, y
25 se agitó para la conjugación del ligador de fármaco

al anticuerpo en un baño de agua a 15°C por 1 hora. Enseguida, se agregó a ésta una solución acuosa (0.0418 ml; 12.9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC), y
5 se agitó para terminar la reacción del ligador de fármaco a temperatura ambiente por 20 minutos.

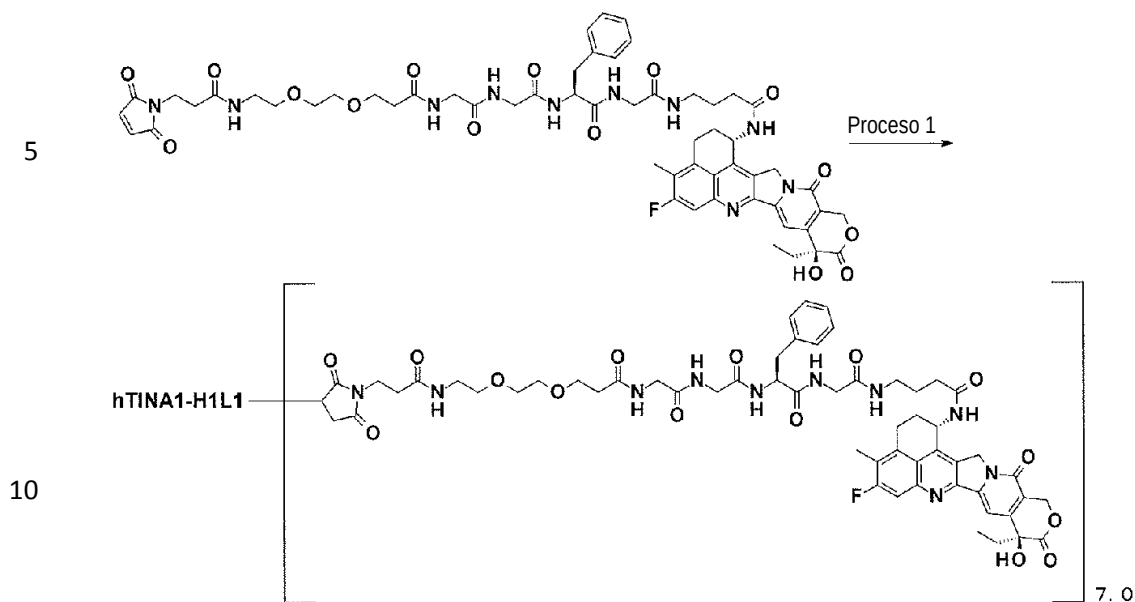
Purificación: La solución anterior fue sometida a purificación utilizando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1, para
10 producir 21.0 ml de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos comunes E y F descritos en el Método de producción 1 ($\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor
15 promedio medido), y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor promedio medido) fueron utilizados), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración del anticuerpo: 2.19 mg/ml, rendimiento del anticuerpo: 46.0 mg (92 %), número
20 promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medida mediante el Procedimiento común E: 3.6, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medida mediante el Procedimiento común F:
25 3.6.

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

Fórmula 28



Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (4)

15 Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 fue preparado para tener la concentración del anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (como el coeficiente de absorción a 280 nm, 1.54 fue utilizado) y el Procedimiento común C descrito

20 en el Método de producción 1. La solución (5.00 ml) fue recolectada dentro de un recipiente de 15 ml, cargado con una solución acuosa de fosfato ácido dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0.0813 ml) con agitación, y luego se agitó a 37°C por 10 minutos. Después de agregar a ésta una solución

25 acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)

(0.162 ml; 5.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) con agitación, y luego la confirmación de que la solución tenía pH de 7.0 ± 0.1 , el enlace disulfuro en la parte de bisagra del anticuerpo fue reducido mediante agitación a 37°C por 1
5 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y el ligador de fármaco: Después de agitar la solución anterior por 10 minutos en un baño de agua de 15°C, se agregó gradualmente a ésta gota a gota, una solución en sulfóxido de dimetilo
10 (0.389 ml; 12.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 5 del Ejemplo 9, y se agitó para la conjugación del ligador de fármaco al anticuerpo en un baño de agua a 15°C por 1 hora. Enseguida, se agregó a ésta una
15 solución acuosa (0.0418 ml; 12.9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC), y se agitó para terminar la reacción del ligador de fármaco a temperatura ambiente por 20 minutos.

Purificación: La solución anterior fue sometida a
20 purificación utilizando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1, para producir 21.0 ml de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco del título.

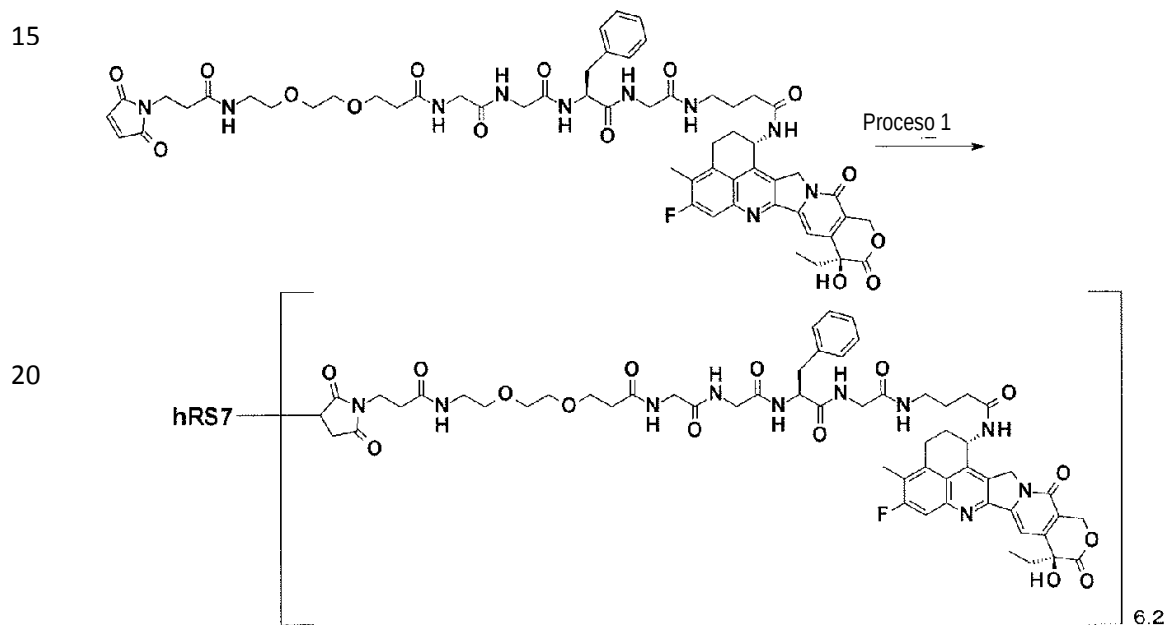
Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de
25 los Procedimientos comunes E y F descritos en el Método de

producción 1 ($\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor promedio medido), y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor promedio medido) fueron utilizados), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración del anticuerpo: 2.19 mg/ml,
 5 rendimiento del anticuerpo: 46.0 mg (92 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medida mediante el Procedimiento común E: 7.0, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de
 10 anticuerpo, medida mediante el Procedimiento común F: 7.0.

Ejemplo de Referencia 13: Producción de hRS7 ADC (5)

Fórmula 29



Proceso 1: Conjugado Anticuerpo-fármaco (5)

Reducción del anticuerpo: El hRS7 producido en el Ejemplo de Referencia 1 fue preparado para tener la concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se utilizó 1.56) y el Procedimiento común C describen el Método de producción 1. La solución (2.0 ml) fue recolectada dentro de un tubo de 4 ml y cargada con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.0690 ml; 5.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de fosfato ácido dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0.100 ml). Después de confirmar que la solución tenía pH de 7.4 ± 0.1, el enlace disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo fue reducido mediante la incubación a 37°C por 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y el ligador de fármaco: Después de la incubación de la solución anterior por 10 minutos en un baño de agua de 15°C, se agregó a ésta una solución en sulfóxido de dimetilo (0.127 ml; 9.2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 5 del Ejemplo 9, y se incubó en la conjugación del ligador de fármaco al anticuerpo en

el baño de agua de 15°C por 1 hora. Enseguida, se agregó a ésta una solución acuosa (0.0190 ml; 13.8 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM) Sigma-Aldrich Co. LLC) y se agitó mediante el uso
5 de un rotador tubular para terminar la reacción del ligador de fármaco a temperatura ambiente por 20 minutos.

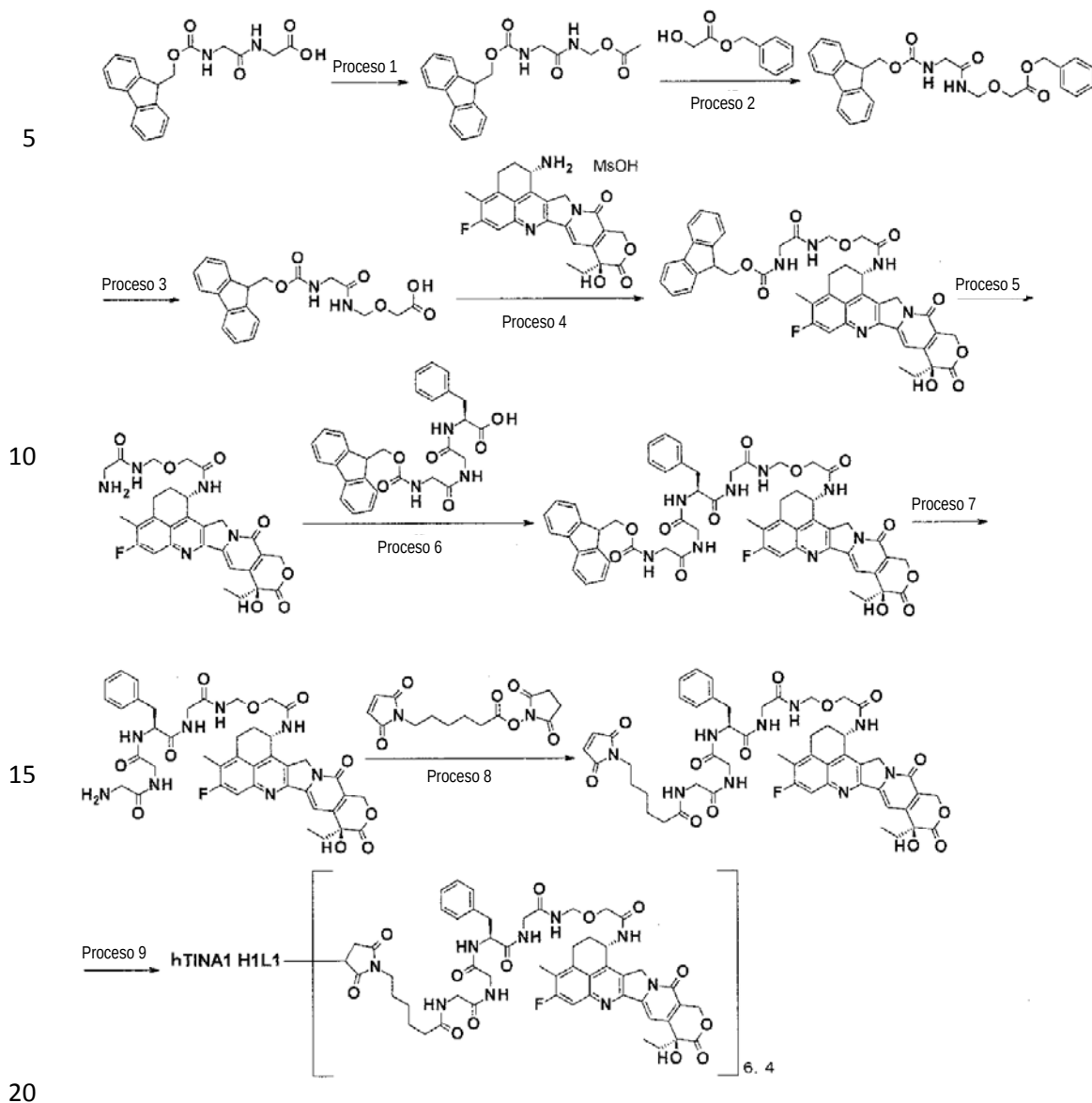
Purificación: La solución anterior fue sometida a purificación utilizando el Procedimiento
10 común D descrito en el Método de producción 1 para producir 9.00 ml de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento común E descrito en el Método
15 de producción 1 ($\epsilon_{D,280} = 4964$ (valor promedio medido), y $\epsilon_{D,370} = 18982$ (valor promedio medido) fueron utilizados), fueron obtenidos los siguientes valores característicos.

Concentración del anticuerpo: 2.04 mg/ml,
20 rendimiento del anticuerpo: 18.4 mg (92 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medidas mediante el Procedimiento común E: 6.2.

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

Fórmula 30



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

A una mezcla que contenía N-9-fluorenilmtoxycarbonilglicilglicina (4.33 g, 12.2 mmol),
 25 tetrahidrofurano (120 ml), y tolueno (40.0 ml), se agregaron

piridina (1.16 ml, 14.7 mmol) y tetraacetato de plomo (6.84 g, 14.7 mmol), y se calentaron bajo reflujo por 5 horas. Después de que la solución de reacción fue enfriada hasta la temperatura ambiente, los materiales insolubles fueron
 5 eliminados mediante filtración a través de Celite, y concentrados bajo presión reducida. Los residuos obtenidos fueron disueltos en acetato de etilo y lavados con agua y salmuera saturada, y luego la capa orgánica fue secada sobre sulfato de magnesio anhidro. Después de que el solvente fue
 10 eliminado bajo presión reducida, los residuos obtenidos fueron purificados mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice [hexano : acetato de etilo = 9 : 1 (v/v) - acetato de etilo] para producir el compuesto del título como un sólido incoloro (3.00 g, 67 %).

15 RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.07 (3H, s), 3.90 (2H, d, J=5.1 Hz), 4.23 (1H, t, J=7.0 Hz), 4.46 (2H, d, J=6.6 Hz), 5.26 (2H, d, J=7.0 Hz), 5.32 (1H, s amplio), 6.96 (1H, s amplio), 7.32 (2H, t, J=7.3 Hz), 7.41 (2H, t, J=7.3 Hz), 7.59 (2H, d, J=7.3 Hz), 7.77 (2H, d, J=7.3 Hz).

20 Proceso 2: [({N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil}amino)metoxil]acetato de bencilo

A una solución en tetrahidrofurano (40.0 ml) del compuesto (3.68 g, 10.0 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior y glicolato de bencilo (4.99 g, 30.0 mmol), se
 25 agregó terc-butóxido de potasio (2.24 g, 20.0 mmol) a 0°C y

se agitó a temperatura ambiente por 15 minutos. La solución de reacción fue cargada con acetato de etilo y agua a 0°C, y extraída con acetato de etilo y cloroformo. La capa orgánica obtenida fue secada sobre sulfato de sodio y filtrada. El
 5 solvente fue eliminado bajo presión reducida. Los residuos obtenidos fueron disueltos en dioxano (40.0 ml) y agua (10.0 ml), cargados con carbonato ácido de sodio (1.01 g, 12.0 mmol) y cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (2.59 g, 10.0 mmol), y se agitaron a temperatura ambiente por 2 horas. La
 10 solución de reacción fue cargada con agua y extraída con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida fue secada sobre sulfato de sodio y filtrada. El solvente fue eliminado bajo presión reducida y los residuos obtenidos fueron purificados mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice [hexano
 15 : acetato de etilo = 100 : 0 (v/v) - 0 : 100] para producir el compuesto del título como una sustancia aceitosa incolora (1.88 g, 40 %).

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.84 (2H, d, J=5.5 Hz), 4.24 (3H, t, J=6.5 Hz), 4.49 (2H, d, J=6.7 Hz), 4.88 (2H, d, J=6.7 Hz), 5.15-5.27 (1H, m), 5.19 (2H, s), 6.74 (1H, s
 20 amplio), 7.31-7.39 (7H, m), 7.43 (2H, t, J=7.4 Hz), 7.61 (2H, d, J=7.4 Hz), 7.79 (2H, d, J=7.4 Hz).

Proceso 3: Ácido [(N-[(9-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil)amino)metoxil]acético

25 El compuesto (1.88 g, 3.96 mmol) obtenido en el

Proceso 2 anterior fue disuelto en etanol (40.0 ml) y acetato de etilo (20.0 ml). Después de agregar el catalizador de carbono sobre paladio (376 mg), ésta se agitó bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente por 2 horas. Los materiales insolubles fueron retirados mediante filtración de Celite, y el solvente fue eliminado bajo presión reducida para producir el compuesto del título como un sólido incoloro (1.52 g, cuantitativa).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 3.62 (2H, d, J=6.3 Hz), 3.97 (2H, s), 4.18-4.32 (3H, m), 4.60 (2H, d, J=6.7 Hz), 7.29-7.46 (4H, m), 7.58 (1H, t, J=5.9 Hz), 7.72 (2H, d, J=7.4 Hz), 7.90 (2H, d, J=7.4 Hz), 8.71 (1H, t, J=6.5 Hz).

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

Bajo enfriamiento con hielo, a una solución en N,N-dimetilformamida (10.0 ml) de mesilato de exatecán (0.283 g, 0.533 mmol), se agregaron N-hidroxisuccinimida (61.4 mg, 0.533 mmol), y el compuesto (0.205 g, 0.533 mmol) obtenido en el Proceso 3 anterior, y se agregaron N,N-diisopropiletilamina (92.9 µl, 0.533 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (0.143 g, 0.693 mmol) y se agitaron a temperatura ambiente por 3 días. El solvente fue eliminado

bajo presión reducida y los residuos obtenidos fueron purificados mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - capa orgánica dividida de cloroformo : metanol : agua = 7 : 3 : 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido café pálido (0.352 g, 82 %).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.81 (3H, t, J=7.4 Hz), 1.73-1.87 (2H, m), 2.06-2.20 (2H, m), 2.34 (3H, s), 3.01-3.23 (2H, m), 3.58 (2H, d, J=6.7 Hz), 3.98 (2H, s), 4.13-4.25 (3H, m), 4.60 (2H, d, J=6.7 Hz), 5.09-5.22 (2H, m), 5.32-5.42 (2H, m), 5.50-5.59 (1H, m), 6.49 (1H, s), 7.24-7.30 (3H, m), 7.36 (2H, t, J=7.4 Hz), 7.53 (1H, t, J=6.3 Hz), 7.66 (2H, d, J=7.4 Hz), 7.75 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.84 (2H, d, J=7.4 Hz), 8.47 (1H, d, J=8.6 Hz), 8.77 (1H, t, J=6.7 Hz).

MS (ESI) m/z: 802 (M+H)⁺.

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

A una solución de N,N-dimetilformamida (11.0 ml) del compuesto (0.881 g, 1.10 mmol) obtenido en el Proceso 4 anterior, se agregó piperidina (1.1 ml) y se agitó a temperatura ambiente por 2 horas. El solvente se eliminó bajo presión reducida para producir una mezcla que contenía el compuesto del título. La mezcla se utilizó para la siguiente reacción sin purificación adicional.

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

Bajo funcionamiento con hielo, a una solución en N,N-dimetilformamida (50.0 ml) de la mezcla (0.439 mmol) obtenida en el Proceso 5 anterior, se agregó la N-hidroxisuccinimida (0.101 g, 0.878 mmol), y la N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanina (Patente Japonesa Abierta al Público No. 2002-60351; 0.440 g, 0.878 mmol), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (0.181 g, 0.878 mmol) y se agitó a temperatura ambiente por 4 días. El solvente fue eliminado bajo presión reducida y los residuos obtenidos fueron purificados mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 9 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido anaranjado pálido (0.269 g, 58 %).

MS (ESI) m/z: 1063 (M+H)⁺.

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

A una solución en N,N-dimetilformamida (4.00 ml) del

compuesto (0.269 g, 0.253 mmol) obtenido en el Proceso 6 anterior, se agregó piperidina (0.251 ml, 2.53 mmol) y se agitó a temperatura ambiente por 2 horas. El solvente se eliminó bajo presión reducida para producir una mezcla que contenía el compuesto del título. La
 5 mezcla fue utilizada para la siguiente reacción sin purificación adicional.

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

A una solución en N,N-dimetilformamida (10.0 ml) del compuesto (0.253 mmol) obtenido en el Proceso 7 anterior, se agregó el 6-maleimido hexanoato de N-succinimidilo (0.156
 15 g, 0.506 mmol) y se agitó a temperatura ambiente por 3 días. El solvente se eliminó bajo presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 9 : 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido
 20 amarillo pálido (0.100 g, 38 %).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.83 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.09-1.21 (2H, m), 1.33-1.47 (4H, m), 1.75-1.90 (2H, m), 2.00-2.23 (4H, m), 2.36 (3H, s), 2.69-2.81 (1H, m), 2.94-3.03 (1H, m), 3.06-3.22 (2H, m), 3.23-3.74 (8H, m), 3.98 (2H, s), 4.39-4.50
 25 (1H, m), 4.60 (2H, d, J=6.7 Hz), 5.17 (2H, s), 5.39 (2H, s),

5.53-5.61 (1H, m), 6.50 (1H, s), 6.96 (2H, s), 7.11-7.24 (5H, m), 7.28 (1H, s), 7.75 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.97 (1H, t, J=5.7 Hz), 8.03 (1H, t, J=5.9 Hz), 8.09 (1H, d, J=7.8 Hz), 8.27 (1H, t, J=6.5 Hz), 8.48 (1H, d, J=9.0 Hz), 8.60 (1H, t, J=6.5 Hz).

5 MS (ESI) m/z: 1034 (M+H)⁺.

Proceso 9: Conjugado anticuerpo-fármaco (6)

Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 fue preparado para tener concentración del anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA
10 mediante el uso del Procedimiento común B (como el coeficiente de absorción a 280 nm, se utilizó 1.54) y el procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (10.0 ml) fue recolectada dentro de un tubo de 50 ml y se le cargó con una solución acuosa de TCEP 10
15 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.317 ml; 4.6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de fosfato ácido dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0.500 ml). Después de confirmar que la solución tuviera un pH de 7.4 ± 0.1, el enlace disulfuro en la parte
20 de bisagra del anticuerpo fue reducido por la incubación a 37°C por 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y el ligador de fármaco: Después de incubar la solución anterior por 10 minutos en un baño de agua de temperatura ordinaria, se
25 agregó sulfóxido de dimetilo (0.567 ml) a ésta.

Subsecuentemente, se agregó una solución de sulfóxido de dimetilo que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 8 anterior (0.635 ml; 9.2 equivalentes por molécula de anticuerpo) y se agitó mediante el uso de un rotador tubular para conjugar el ligador de fármaco al anticuerpo a temperatura ambiente por 40 minutos. Enseguida, se agregó a ésta una solución acuosa (0.127 ml; 18.4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) y se agitó para terminar la reacción del ligador de fármaco a temperatura ambiente por otros 20 minutos.

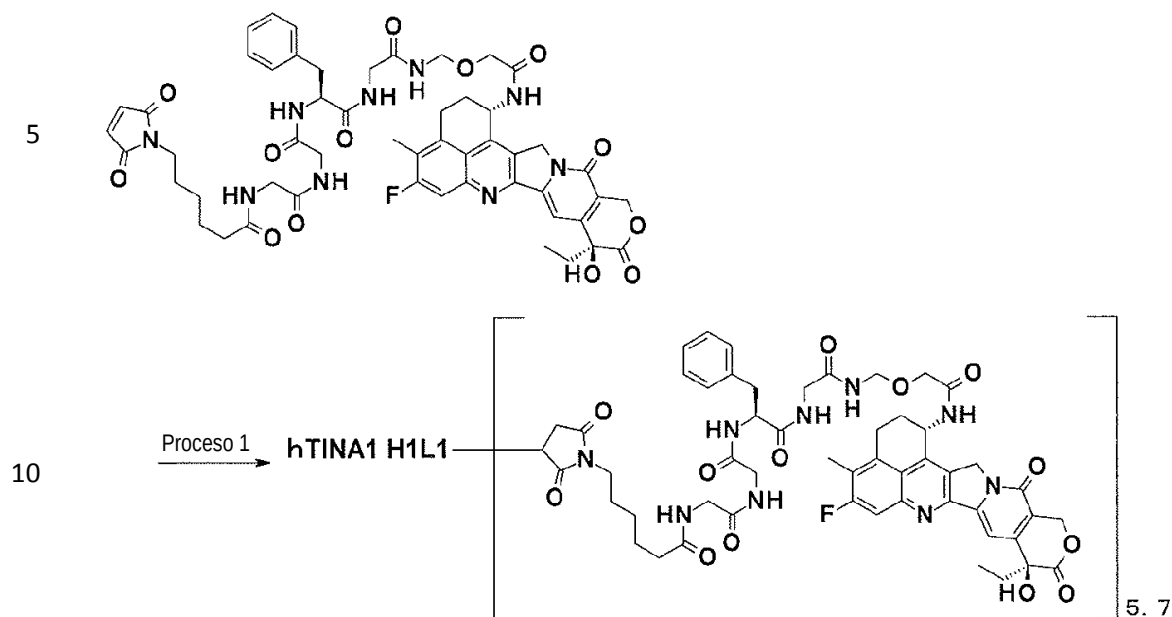
Purificación: La solución anterior fue sometida a purificación utilizando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1 para producir 35.0 ml de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: mediante el uso del Procedimiento común E descrito en el Método de producción 1 ($\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor promedio medido), y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor promedio medido) fueron utilizados), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración del anticuerpo: 2.70 mg/ml, rendimiento del anticuerpo: 94.5 mg (95 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido mediante el Procedimiento común E: 6.4.

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

Fórmula 31

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (7)

15 Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 fue preparado para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se utilizó 1.54) y el Procedimiento común C descrito en

20 el Método de producción 1. La solución (2.0 ml) fue recolectada dentro de un tubo de 4 ml y cargada con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.0690 ml; 5.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de fosfato ácido dipotásico

25 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0.0299 ml). Después de confirmar

que la solución tuviera un pH de 7.0 ± 0.1 , el enlace disulfuro en la parte de bisagra del anticuerpo fue reducido por incubación a 37°C por 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y el ligador de

5 fármaco: Después de incubar la solución anterior por 10 minutos en un baño de agua de 15°C , se agregó a ésta una solución en sulfóxido de dimetilo (0.127 ml; 9.2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 8 del Ejemplo 14, y se incubó para la
10 conjugación del ligador de fármaco al anticuerpo en un baño de agua de 15°C por 1 hora. Enseguida, se agregó a ésta una solución acuosa (0.0190 ml; 13.8 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) y se agitó mediante el uso de un rotador tubular para terminar la
15 reacción del ligador de fármaco a temperatura ambiente por 20 minutos.

Purificación: La solución anterior fue sometida a purificación utilizando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1, para producir 9.00 ml de una
20 solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco del título.

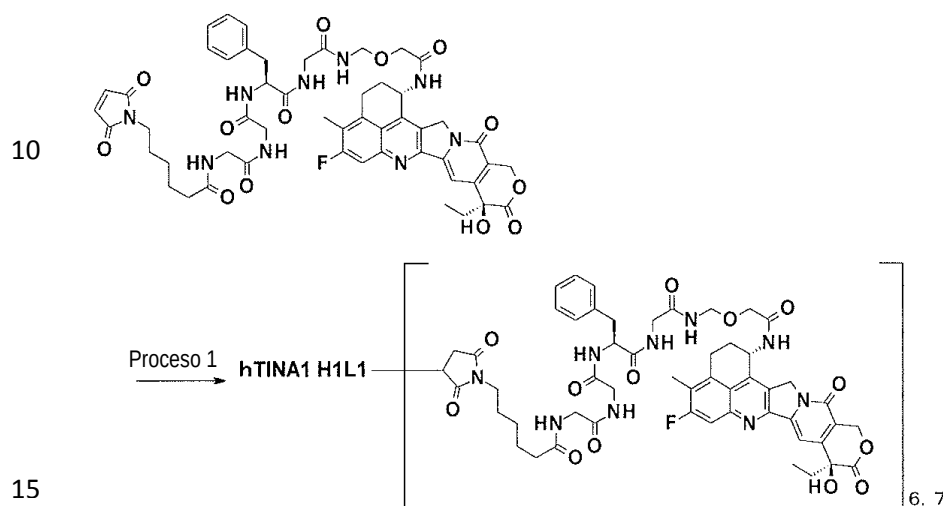
Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento común E descrito en el Método de producción 1 ($\epsilon_{\text{D},280} = 5178$ (valor promedio medido), y $\epsilon_{\text{D},370} = 20217$ (valor
25 promedio medido) fueron utilizados), se obtuvieron los

siguientes valores característicos.

Concentración del anticuerpo: 2.04 mg/ml,
rendimiento del anticuerpo: 18.4 mg (92 %), y número promedio
de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de
5 anticuerpo, medido mediante el Procedimiento común E: 5.7.

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

Fórmula 32



Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (8)

Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido
en el Ejemplo 7 fue preparado para tener una concentración de
20 anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del
Procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280
nm, se utilizó 1.54) y el Procedimiento común C descrito en
el Método de producción 1. La solución (30.0 ml) fue
recolectada dentro de un recipiente de 100 ml, cargada con
25 una solución acuosa de fosfato ácido dipotásico 1 M (Nacalai Tesque,

Inc.; 0.4875 ml) con agitación, y luego se agitó a 37°C por minutos. Después de agregar a ésta una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.9721 ml; 5.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) con agitación y luego confirmando que la solución
5 tuviera un pH de 7.0 ± 0.1 , el enlace disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo fue reducido mediante la agitación a 37°C por 1 hora.

Conjugación entre del anticuerpo y el ligador de fármaco: Después de agitar la solución anterior por 10 minutos en un baño de agua a 15°C, se agregó gradualmente
10 gota a gota a ésta una solución en sulfóxido de dimetilo (2.33 ml; 12.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 8 del Ejemplo 14, y se agitó para la conjugación del ligador de fármaco al anticuerpo en un baño de agua de 15°C por 1
15 hora. Enseguida, se agregó a ésta una solución acuosa (0.251 ml; 12.9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) y se agitó para terminar la reacción del ligador de fármaco a temperatura ambiente por 20 minutos.

20 Purificación: La solución anterior fue sometida a purificación utilizando el procedimiento común D descrito en el Método de producción 1, para producir 98.0 ml de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco del título. Luego, la solución fue concentrada de acuerdo al
25 Procedimiento común A descrito en el Método de producción 1,

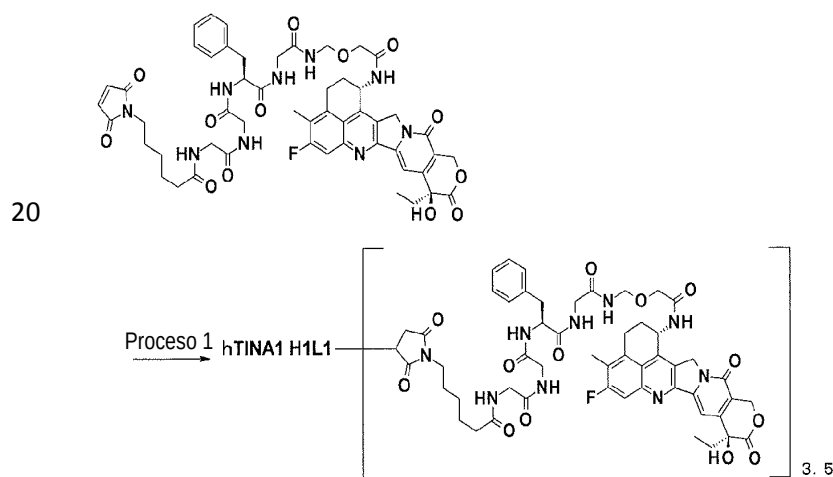
para producir 17.5 ml de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos comunes E y F descritos en el Método de producción 1 ($\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor promedio medido), y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor promedio medido) fueron utilizados), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración del anticuerpo: 14.6 mg/ml, rendimiento del anticuerpo: 256 mg (85 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula del anticuerpo, medido mediante el Procedimiento común E: 6.7, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido mediante el Procedimiento común F: 7.0.

15 Ejemplo 17: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (9)

Fórmula 33



Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (9)

Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 fue preparado para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA
5 mediante el uso del Procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se utilizó 1.54) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (5.0 ml) fue recolectada dentro de un recipiente de 15 ml, cargada con una solución acuosa de
10 fosfato hidrógeno dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0.0813 ml) con agitación, y luego se agitó a 37°C por 10 minutos. Después de agregar a ésta una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.0778 ml; 2.4 equivalentes por molécula de anticuerpo) con
15 agitación y luego confirmando que la solución tuviera un pH de 7.0 ± 0.1 , el enlace disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo fue reducido mediante la agitación a 37°C por 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y el ligador de
20 fármaco: Después de agitar la solución anterior por 10 minutos en un baño de agua a 15°C, se agregó gradualmente gota a gota a ésta una solución en sulfóxido de dimetilo (0.162 ml; 5.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 8
25 del Ejemplo 14, y se agitó para la conjugación del

ligador de fármaco al anticuerpo en un baño de agua de 15°C por 1 hora. Enseguida, se agregó a ésta una solución acuosa (0.0418 ml; 12.9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) y se
5 agitó para terminar la reacción del ligador de fármaco a temperatura ambiente por 20 minutos.

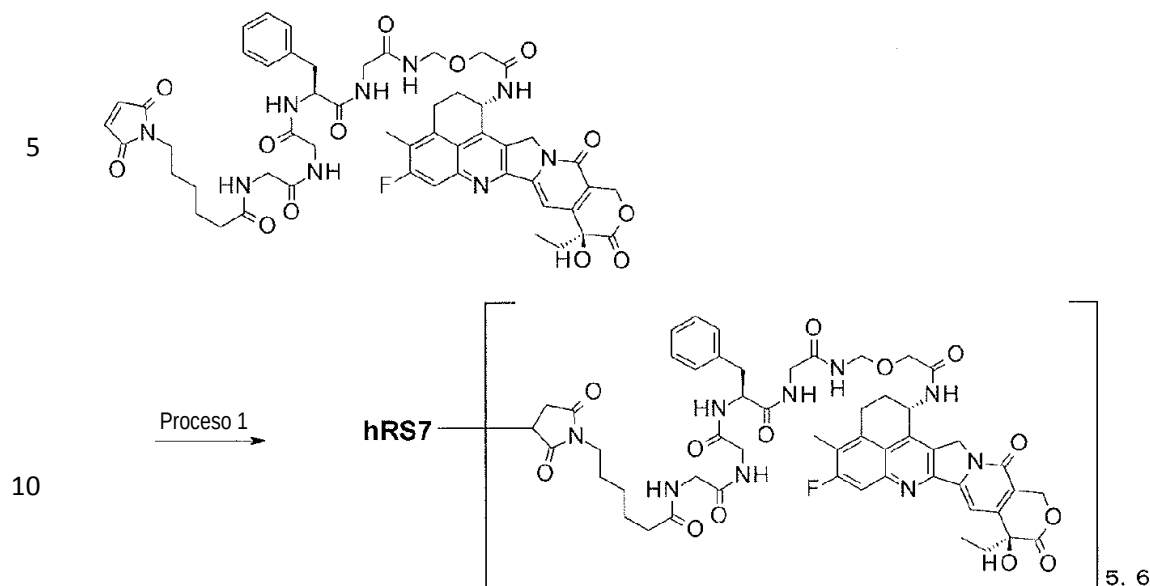
Purificación: La solución anterior fue sometida a purificación utilizando el procedimiento común D descrito en el Método de producción 1, para producir 21.0
10 ml de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos comunes E y F descritos en el Método de producción 1 ($\epsilon_{D,280} = 5178$ (valor promedio
15 medido), y $\epsilon_{D,370} = 20217$ (valor promedio medido) fueron utilizados), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración del anticuerpo: 2.26 mg/ml, rendimiento del anticuerpo: 47.5 mg (95 %), número promedio
20 de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula del anticuerpo, medido mediante el Procedimiento común E: 3.5, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido mediante el Procedimiento común F: 3.6.

Ejemplo de Referencia 18: Producción de hRS7 ADC (10)

Fórmula 34

Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (10)

Reducción del anticuerpo: El hRS7 producido en

15 el Ejemplo de referencia 7 fue preparado para tener una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280 nm, se utilizó 1.56) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción

20 1. La solución (2.0 ml) fue recolectada dentro de un tubo de 4 ml y cargada con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.0690 ml; 5.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de fosfato ácido dipotásico 1 M (Nacalai Tesque,

25 Inc.; 0.0299 ml). Después de confirmar que la solución

tuviera un pH de 7.0 ± 0.1 , el enlace disulfuro en la parte de bisagra del anticuerpo fue reducido por incubación a 37°C por 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y el ligador de

5 fármaco: Después de incubar la solución anterior por 10 minutos en un baño de agua de 15°C , se agregó a ésta una solución en sulfóxido de dimetilo (0.1269 ml; 9.2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 8 del Ejemplo 14, y se
10 incubó para la conjugación del ligador de fármaco al anticuerpo en un baño de agua de 15°C por 1 hora. Enseguida, se agregó a ésta una solución acuosa (0.0190 ml; 13.8 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) y se agitó mediante el uso de un
15 rotador tubular para terminar la reacción del ligador de fármaco a temperatura ambiente por 20 minutos.

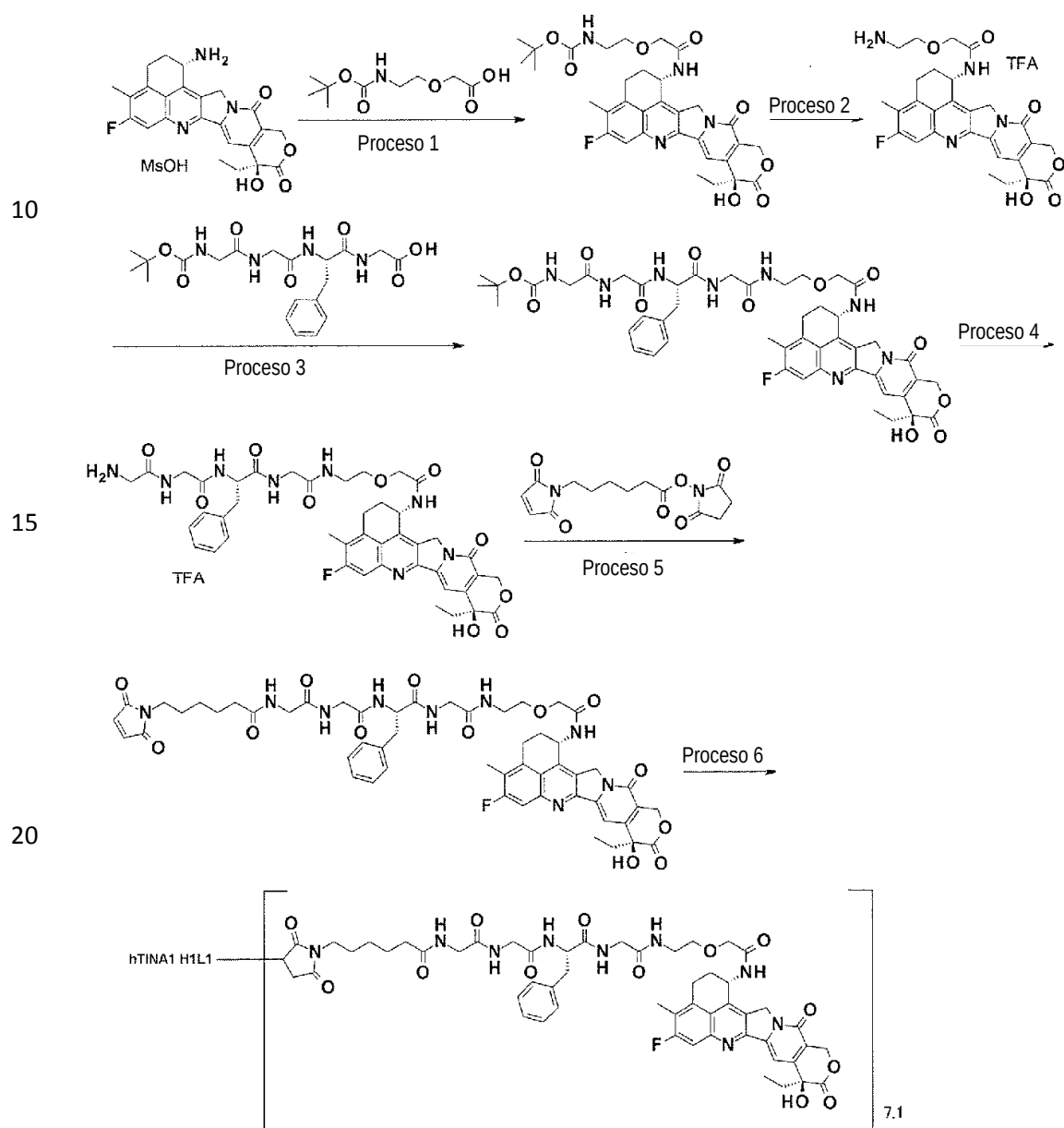
Purificación: La solución anterior fue sometida a purificación utilizando el Procedimiento común D descrito en el Método de producción 1, para producir 9.00 ml de una solución
20 que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del Procedimiento común E descrito en el Método de producción 1 ($\epsilon_{\text{D},280} = 5178$ (valor promedio medido), y $\epsilon_{\text{D},370} = 20217$ (valor promedio medido) fueron utilizados), se obtuvieron los
25 siguientes valores característicos.

Concentración del anticuerpo: 2.07 mg/ml,
rendimiento del anticuerpo: 18.6 mg (93 %), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido mediante el Procedimiento común E: 5.6.

5 **Ejemplo 19: Producción de hTINA1-H1L1 ADC (11)**

Fórmula 35



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

El mesilato de exatecán (3.10 g, 5.47 mol) se hizo reaccionar de la misma manera que el Proceso 1 del Ejemplo 1 mediante el uso del ácido {2-[(terc-Butoxicarbonil)amino]etoxi}acético (J. Med. Chem., 1992,
 10 Vol. 35, p. 2928; 1.55 g, 6.01 mmol) en vez del ácido 4-(terc-Butoxicarbonilamino)butanoico para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (2.56 g, 73 %).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.87 (3H, t, J = 7.3
 15 Hz), 1.26 (9H, s), 1.81-1.91 (2H, m), 2.13-2.22 (2H, m), 2.40 (3H, s), 3.08-3.26 (4H, m), 3.43-3.53 (2H, m), 4.00 (1H, d, J = 15.1 Hz), 4.05 (1H, d, J = 15.1 Hz), 5.14 (1H, d, J = 18.7 Hz), 5.22 (1H, d, J = 18.7 Hz), 5.40 (1H, d, J = 16.6 Hz), 5.44 (1H, d, J = 16.6 Hz), 5.59-5.66 (1H, m),
 20 6.53 (1H, s), 6.86 (1H, t, J = 5.4 Hz), 7.31 (1H, s), 7.79 (1H, d, J = 10.9 Hz), 8.49 (1H, d, J = 9.1 Hz).

MS (APCI) m/z: 637 (M+H)⁺.

Proceso 2: Trifluoroacetato de 2-(2-Aminoetoxi)-N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-
 25 2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-

benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]acetamida

El compuesto (1.50 g, 2.36 mol) obtenido en el Proceso 1 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que el Proceso 2 del Ejemplo 1, para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (1.50 g, cuantitativo).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.87 (3H, t, J = 7.5 Hz), 1.81-1.92 (2H, m), 2.15-2.23 (2H, m), 2.41 (3H, s), 3.05 (2H, t, J = 5.1 Hz), 3.15-3.23 (2H, m), 3.71 (2H, t, J = 5.1 Hz), 4.10 (2H, s), 5.19 (1H, d, J = 18.7 Hz), 5.24 (1H, d, J = 18.7 Hz), 5.43 (2H, s), 5.58-5.66 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.33 (1H, s), 7.73-7.84 (4H, m), 8.55 (1H, d, J = 9.1 Hz).

MS (APCI) m/z: 537 (M+H)⁺.

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

El compuesto (554 mg, 0.85 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que el Proceso 3 del Ejemplo 1 para producir el Compuesto del título (775 mg, 95 %).

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.85 (3H, t, J = 7.3 Hz), 1.36 (9H, s), 1.78-1.89 (2H, m), 2.13-2.22 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.71 (1H, dd, J = 13.4, 9.8 Hz), 2.95 (1H, dd, J =

13.4, 4.3 Hz), 3.09-3.23 (1H, m), 3.23-3.32 (2H, m), 3.40-3.62 (8H, m), 3.73 (1H, dd, J = 16.5, 5.5 Hz), 4.03 (2H, s), 4.39-4.47 (1H, m), 5.17 (1H, d, J = 18.9 Hz), 5.25 (1H, d, J = 18.9 Hz), 5.41 (1H, d, J = 16.8 Hz), 5.45 (1H, d, J = 16.8 Hz), 5.57-5.64 (1H, m), 6.54 (1H, s), 6.99 (1H, t, J = 5.8 Hz), 7.13-7.26 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.76-7.82 (2H, m), 7.90 (1H, t, J = 5.2 Hz), 8.13 (1H, d, J = 7.9 Hz), 8.27 (1H, t, J = 5.8 Hz), 8.49 (1H, d, J = 8.5 Hz).

MS (APCI) m/z: 955 (M+H)⁺.

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

15 El compuesto (630 mg, 0.659 mmol) obtenido en el Proceso 3 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que el Proceso 4 del Ejemplo 1 para producir el compuesto del título (588 mg, 92 %).

20 RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.86 (3H, t, J = 7.3 Hz), 1.79-1.90 (2H, m), 2.13-2.22 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.71 (1H, dd, J = 13.4, 10.1 Hz), 2.99 (1H, dd, J = 13.4, 4.3 Hz), 3.09-3.23 (1H, m), 3.24-3.32 (3H, m), 3.41-3.71 (7H, m), 3.86 (1H, dd, J = 16.8, 5.8 Hz), 4.04 (2H, s), 4.52 (1H, td, J = 9.0, 4.1 Hz), 5.17 (1H, d, J = 18.9 Hz), 5.25 (1H, d, J = 18.9 Hz), 5.41 (1H, d, J = 16.5 Hz), 5.45 (1H, d, J = 16.5

Hz), 5.56-5.65 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.13-7.26 (5H, m), 7.32 (1H, s), 7.80 (1H, d, J = 11.0 Hz), 7.87-8.01 (4H, m), 8.29-8.36 (2H, m), 8.46-8.55 (2H, m).

MS (APCI) m/z: 855 (M+H)⁺.

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

10 El compuesto (240 mg, 0.247 mmol) obtenido en el Proceso 4 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que el Proceso 5 del Ejemplo 1, mediante el uso de trietilamina (31.4 µl, 0.22 mmol) en vez de la diisopropiletilamina y el hexanoato de N-succinimidil-6-maleimida (95.3 mg, 0.31 mmol)

15 en vez del 3-(2-(2-(3-maleinimidopropanamido)etoxi)etoxi)propanoato de N-succinimidilo para producir el compuesto del título (162 mg, 62 %).

 RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0.86 (3H, t, J = 7.6

20 Hz), 1.13-1.22 (2H, m), 1.40-1.51 (4H, m), 1.78-1.90 (2H, m), 2.09 (2H, t, J = 7.6 Hz), 2.14-2.21 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.74 (1H, dd, J = 13.6, 9.7 Hz), 2.96 (1H, dd, J = 13.6, 4.5 Hz), 3.08-3.24 (1H, m), 3.24-3.30 (1H, m), 3.33-3.40 (4H, m), 3.47-3.68 (7H, m), 3.72 (1H, dd, J = 16.6, 5.7 Hz), 4.03 (2H,

25 s), 4.42 (1H, td, J = 8.6, 4.2 Hz), 5.17 (1H, d, J = 18.7

Hz), 5.25 (1H, d, $J = 18.7$ Hz), 5.40 (1H, d, $J = 17.2$ Hz),
 5.44 (1H, d, $J = 17.2$ Hz), 5.57-5.64 (1H, m), 6.52 (1H, s),
 6.99 (2H, s), 7.13-7.25 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.74-7.81 (2H,
 m), 7.99 (1H, t, $J = 5.7$ Hz), 8.03-8.11 (2H, m), 8.22 (1H, t,
 5 $J = 5.7$ Hz), 8.47 (1H, d, $J = 9.1$ Hz).

MS (APCI) m/z : 1048 (M+H)⁺.

Proceso 6: Conjugado anticuerpo-fármaco (11)

Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido
 en el Ejemplo 7 se preparó para tener concentración del
 10 anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA mediante el uso en el
 Procedimiento común B (como coeficiente de absorción a 280
 nm, se utilizó 1.54) y el Procedimiento común C descrito en
 el Método de producción 1. La solución (3.0 ml) se recolectó
 dentro de un recipiente de 15 ml, se cargó con una solución
 15 acuosa de fosfato ácido dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.;
 0.0488 ml) con agitación, y luego se agitó a 37°C por 10
 minutos. Después de agregar a ésta una solución acuosa de
 TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.0972 ml;
 5.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) con agitación y
 20 luego confirmando que la solución tuviera un pH de 7.0 ± 0.1 ,
 el enlace disulfuro en la parte de bisagra del anticuerpo fue
 reducido mediante agitación a 37°C por 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y el ligador de
 fármaco: después de agitar la solución anterior por 10
 25 minutos en un baño de agua de 15°C, se agregó gradualmente

gota a gota a ésta una solución en sulfóxido de dimetilo (0.2333 ml; 12.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 8 del Ejemplo 11, y se agitó para la conjugación del ligador de fármaco al anticuerpo en un baño de agua de 15°C por 1 hora. Enseguida, se agregó a ésta una solución acuosa (0.0251 ml; 12.9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) y se agitó para terminar la reacción del ligador de fármaco a temperatura ambiente por 20 minutos.

10 Purificación: La solución anterior fue sometida a purificación utilizando el Procedimiento D descrito en el método de producción 1 para producir 14 ml de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco del título.

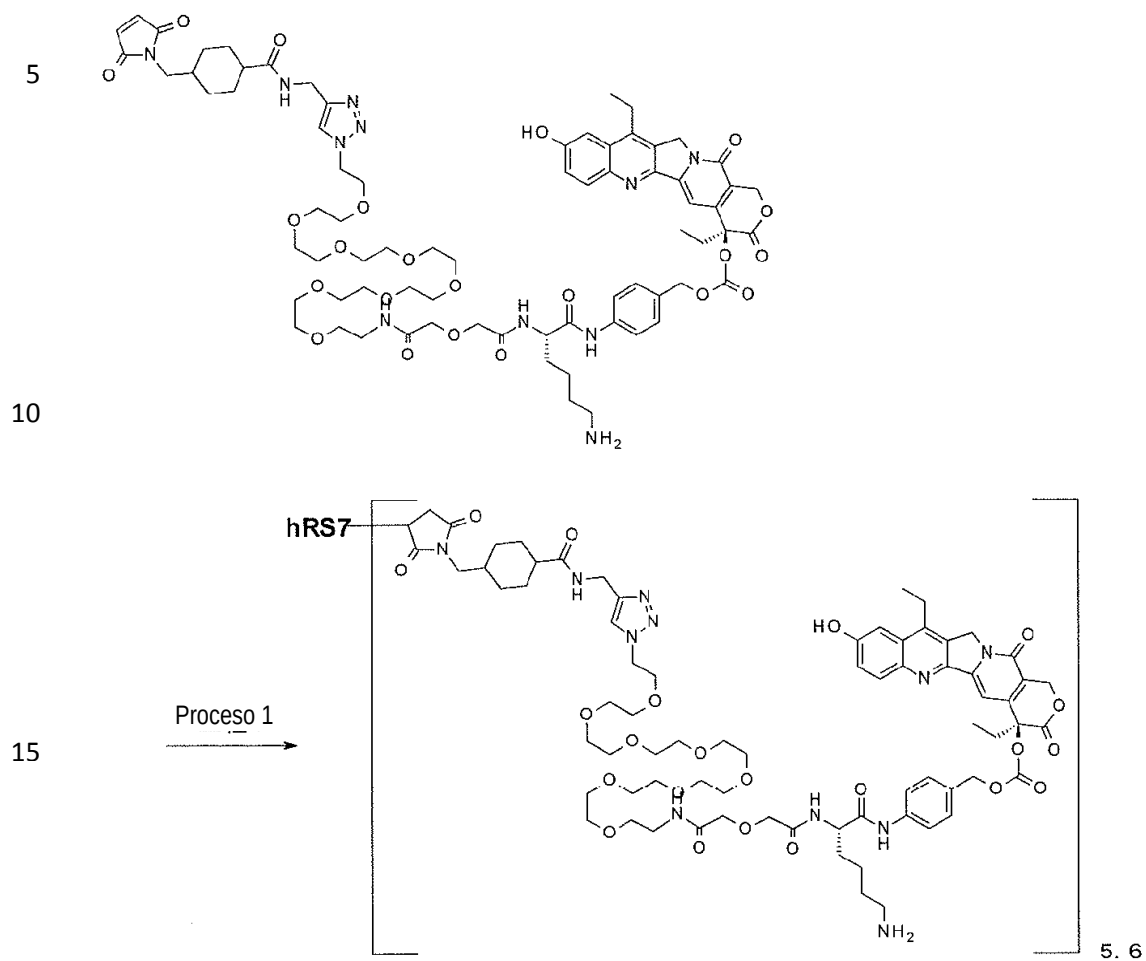
15 Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso de los Procedimientos comunes E y F descritos en el Método de producción 1 ($\epsilon_{D,280} = 5193$ (valor promedio medido), y $\epsilon_{D,370} = 20347$ (valor promedio medido) fueron utilizados), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

20 Concentración del anticuerpo: 1.93 mg/ml, rendimiento del anticuerpo: 27.0 mg (90 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula del anticuerpo, medido mediante el Procedimiento común E: 7.1, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medido mediante el Procedimiento
25 común F: 7.0.

Ejemplo de Referencia 2: Producción de hRS7-CL2A-

SN38 (12)

Fórmula 36



Proceso 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (12)

20 Reducción del anticuerpo: El hRS7 producido en el
Ejemplo de Referencia 1 fue preparado para tener
concentración de anticuerpo de 10 mg/ml con PBS6.0/EDTA
mediante el uso del Procedimiento común B (como coeficiente
de absorción a 280 nm, se utilizó 1.54) y el Procedimiento
25 común C descrito en el Método de producción 1. La solución

(10.0 ml) fue recolectada dentro de un tubo de 50 ml y cargada con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.317 ml; 4.6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de fosfato ácido dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0.500 ml). Después de confirmar que la solución tenía pH de 7.4 ± 0.1 , el enlace disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo fue reducido por incubación a 37°C por 1 hora.

Conjugación entre anticuerpo y ligador de fármaco:

Después de incubar la solución anterior por 10 minutos en un baño de agua de temperatura ordinaria, se agregó a ésta sulfóxido de dimetilo (0.567 ml). Subsecuentemente, se agregó a ésta una solución en sulfóxido de dimetilo que contenía 10 mM de CL2A-SN38 sintetizado de acuerdo a la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2011/0293513 (0.635 ml; 9.2 equivalentes por moléculas de anticuerpo) y se agitó mediante el uso de un rotador tubular para conjugar el ligador de fármaco al anticuerpo a temperatura ambiente por 40 minutos. En seguida, se agregó una solución acuosa (0.127 ml; 18.4 equivalentes por molécula de anticuerpo) de 100 mM de NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) y se agitó para terminar la reacción del ligador de fármaco a temperatura ambiente por otros 20 minutos.

Purificación: La solución de reacción anterior fue sometida repetitivamente dos veces a filtración en gel y la

purificación descrita en el Procedimiento común D del Método de producción y subsecuentemente se sometió de manera similar a la purificación por filtración en gel con la columna NAP-25 utilizando la solución de trehalosa 25 mM que contenía polisorbato 80 (al 0.01%).

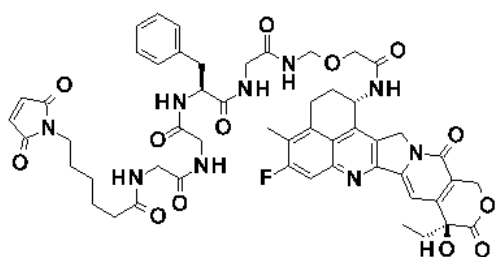
5 Luego, el eluido obtenido (35 ml) fue liofilizado.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso el Procedimiento común E descrito en el Método de producción 1 para el eluido antes de la liofilización, fueron obtenidos los siguientes valores característicos.

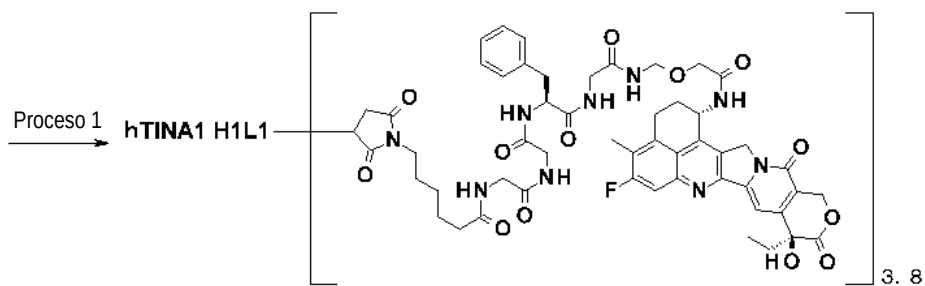
10 Concentración del anticuerpo: 2.78 mg/ml, rendimiento del anticuerpo: 97.3 mg (97%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por moléculas de anticuerpo: 5.6.

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

15 Fórmula 37



20



25

Proceso 1: Conjugado de anticuerpo-fármaco (13)

Reducción del anticuerpo: El hTINA1-H1L1 producido en el Ejemplo 7 fue preparado para tener concentración del anticuerpo de 10 mg/ml, mediante el reemplazo del medio con PBS6.0/EDTA mediante el uso del Procedimiento común B (como el coeficiente de absorción a 280 nm, fue utilizado 1.54) y el Procedimiento común C descrito en el Método de producción 1. La solución (100 ml) fue colocada en un matraz Erlenmeyer de polycarbonato a 250 ml, cargado con una solución acuosa de fosfato ácido dipotásico 1 M (1.4 ml) a temperatura ambiente con agitación utilizando un agitador magnético, y luego se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (1.62 ml; 2.5 equivalentes por molécula de anticuerpo). Después de confirmar que la solución tenía un pH de 7.0 ± 0.1 , la agitación fue terminada, y el enlace disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo fue reducido mediante la incubación a 37°C por 2 horas.

Conjugación entre anticuerpo y el ligador de fármaco: Después del enfriamiento de la solución anterior a 15°C, se agregó gradualmente gota a gota a ésta DMSO (3.24 ml) con agitación. Subsecuentemente, se agregó gradualmente gota a gota a ésta, una solución en DMSO que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Proceso 8 del Ejemplo 14 (1.76 ml; 5.0 equivalentes por molécula de anticuerpo). Esta solución fue agitada para la conjugación del ligador de

fármaco al anticuerpo a 15°C por 1 hora. En seguida, se agregó a ésta una solución acuosa (0.324 ml; 5.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM con agitación, y se incubó para terminar la reacción del ligador de fármaco sin
5 reaccionar a temperatura ambiente por otros 20 minutos.

Purificación: Solución acuosa al 20% de ácido acético (aproximadamente 0.52 ml) y ABS (100 ml) fueron gradualmente agregados a la solución anterior con agitación para ajustar el pH de la solución a 5.5 ± 0.1 . Esta solución
10 fue sometida a microfiltración (0.45 μ m, membrana de PVDF) para eliminar la turbidez blanca y producir aproximadamente 200 ml de un filtrado. Este filtrado fue sometido a purificación por ultrafiltración utilizando un aparato de ultrafiltración compuesto de una membrana de ultrafiltración
15 (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Ultracell 30 KDa), una bomba tubular (Cole-Parmer International, Bomba MasterFlex modelo 77521-40, Cabeza de Bomba modelo 7518-00), y un tubo (Cole-Parmer International, Tubo MasterFlex L/S16). Específicamente, mientras que el ABS fue agregado gota a gota
20 (un total de 1600 ml) como una solución amortiguadora para la purificación a la solución de reacción, la purificación por ultrafiltración fue realizada para remover los ligadores de fármaco no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular, también reemplazando la solución amortiguadora con
25 ABS, y concentrando adicionalmente la solución. La solución

purificada obtenida fue sometida a microfiltración (0.22 μm , membrana de PVDF) para producir 88 ml de una solución que contenía el conjugado anticuerpo-fármaco del título.

Caracterización fisicoquímica: Mediante el uso del
 5 Procedimiento común E y el Procedimiento común F ($\epsilon_{\text{D},280} = 5178$, y $\epsilon_{\text{D},370} = 20217$ fueron utilizados), fueron obtenidos los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 9.96 mg/ml,
 rendimiento del anticuerpo: 876 mg (88%), número promedio de
 10 moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo, medida por el Procedimiento común E: 3.8, y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo medida por el Procedimiento común F: 3.8.

15 **Ejemplo 21: Evaluación del efecto antitumoral de ADC**

21-a) Efecto antitumoral de ADC - (1)

Ratones: Ratones BALB/c-nu/un hembra de 5- a 6- semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) fueron aclimatados por 4 a 7 días bajo condiciones de SPF
 20 antes del uso en el experimento. Los ratones fueron alimentados con alimento sólido esterilizado (FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd) y se les dio agua de la llave esterilizada (preparada por la adición de 5 a 15 ppm de solución de hipoclorito de sodio).

25 Ensayo y expresión del cálculo: En todos los

estudios, el eje mayor y el eje menor del tumor fueron medidos dos veces a la semana mediante el uso de un calibrador digital electrónico (CD-15C, Mitutoyo Corp.), y el volumen tumoral (mm^3) fue calculado. La expresión del
5 cálculo es mostrada en seguida.

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

Todos los conjugados anticuerpo-fármaco fueron diluidos con solución salina fisiológica (Otsuka
10 Pharmaceutical Factory, Inc.) y utilizados a un volumen de 10 ml/kg para la administración intravenosa a la cola de cada ratón. Fue adquirida una línea celular de cáncer colorrectal humano COLO205, de la ATCC y suspendida en solución salina fisiológica. 2×10^6 células de la suspensión fue
15 subcutáneamente trasplantada a la parte derecha del abdomen de cada ratón hembra BALB/c-nu/nu (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados en el Día 7. El conjugado anticuerpo-fármaco (1), (6), o (12) fue intravenosamente administrado a una dosis de 10 mg/kg a la cola de cada ratón
20 en los Días 7, 14, y 21. El anticuerpo hTINA1-H1L1 no conjugado y el anticuerpo hRS7 fueron cada uno administrados con un control negativo a una dosis de 25 mg/kg a través de la misma vía que se describe anteriormente. La administración del conjugado anticuerpo-fármaco (1) o (6)
25 disminuyó notablemente el volumen tumoral en comparación a la

administración del conjugado anticuerpo-fármaco (12), y ambos conjugados anticuerpo-fármaco ejercieron un efecto inhibitorio del crecimiento tumoral (Figura 13). En la figura, las abscisas describen el número de días, y las ordenadas describen el volumen tumoral.

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

Una línea celular de adenocarcinoma pancreático humano Bx-PC3 adquirido de la ATCC fue trasplantada a cada ratón BALB/c-nu/nu hembra y posteriormente pasado como un injerto de tumor sólido. Este injerto tumoral fue subcutáneamente trasplantado al abdomen derecho de cada ratón BALB/c-nu/nu hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados en el Día 16. El conjugado anticuerpo-fármaco (1), (6), o (12) fue intravenosamente administrado a una dosis de 10 mg/kg a la cola de cada ratón en los Días 16, 23, y 30. El anticuerpo hTINA1-H1L1 no conjugado y el anticuerpo hRS7 fueron cada uno administrados como un control negativo a una dosis de 25 mg/kg a través de la misma vía como se describe anteriormente. La administración del conjugado anticuerpo-fármaco (1) o (6) disminuyó notablemente el volumen tumoral en comparación a la administración del conjugado anticuerpo-fármaco (12), y ambos conjugados anticuerpo-fármaco ejercieron un efecto inhibitorio de crecimiento tumoral (Figura 14).

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

Una línea celular de adenocarcinoma pancreático humana Capan-1 adquirida de la ATCC fue trasplantada a cada ratón BALB/c-nu/nu hembra y posteriormente pasado como un
5 injerto tumoral sólido. Este injerto tumoral trasplantado fue subcutáneamente en el abdomen derecho de cada ratón BALB/c-nu/nu hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados en el Día 18. El conjugado anticuerpo-fármaco (1), (6), o (12) fue administrado
10 intravenosamente a una dosis de 10 mg/kg a la cola de cada ratón en los Días 18, 25, y 32. El anticuerpo hTINA1-H1L1 no conjugado y el anticuerpo hRS7 fueron cada uno administrados como un control negativo a una dosis de 25 mg/kg a través de la misma vía como se describe anteriormente. La
15 administración del conjugado anticuerpo-fármaco (1) o (6) disminuyó notablemente el volumen tumoral en comparación a la administración del conjugado anticuerpo-fármaco (12), y ambos conjugados anticuerpo-fármaco ejercieron un efecto inhibitorio del crecimiento tumoral (Figura 15).

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

COLO205 fue subcutáneamente trasplantado a cada ratón BALB/c-nu/nu hembra de la misma manera que en el Ejemplo 21-a) (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados en el Día 11. El conjugado anticuerpo-fármaco (2)
25 o (5) a una dosis de 10 mg/kg y el conjugado anticuerpo-

fármaco (7) o (10) a una dosis de 3 mg/kg, fueron intravenosamente administrados, respectivamente, a la cola de cada ratón en los Días 11, 18, y 25. Todos los conjugados anticuerpo-fármaco (2), (5), (7), y (10) administrados, 5 ejercieron un efecto inhibitorio de crecimiento tumoral (Figura 16).

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

Bx-PC3 fue subcutáneamente trasplantado a cada ratón BALB/c-nu/nu hembra de la misma manera que en el 10 Ejemplo 21-b) (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados en el Día 25. El conjugado anticuerpo-fármaco (2), (5), (7), o (10) fue intravenosamente administrado a una dosis de 3 mg/kg a la cola de cada ratón en los Días 25 y 32. Todos los conjugados anticuerpo-fármaco (2), (5), (7), y (10) 15 administrados, ejercieron un efecto inhibitorio de crecimiento tumoral (Figura 17).

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

COLO205 fue subcutáneamente trasplantada a cada ratón BALB/c-nu/nu hembra de la misma manera que en el 20 Ejemplo 21-a) (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados en el Día 9. El conjugado anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), o (9) fue intravenosamente administrado a una dosis de 10 mg/kg a la cola de cada ratón en los Días 9 y 16. Todos los conjugados anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), y (9) 25 administrados, ejercieron un efecto inhibitorio de

crecimiento tumoral (Figura 18).

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

Bx-PC3 fue subcutáneamente trasplantada a cada
ratón BALB/c-nu/nu hembra de la misma manera que en el
5 Ejemplo 21-b) (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente
agrupados en el Día 21. El conjugado anticuerpo-fármaco (3),
(4), (8), o (9) fue intravenosamente administrado a una dosis
de 3 mg/kg a la cola de cada ratón en los Días 21 y 28.
Todos los conjugados anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), y (9)
10 administrados, ejercieron un efecto inhibitorio de
crecimiento tumoral (Figura 19).

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

8×10^6 células de una línea celular de cáncer de
ovario humano NIH:OVCAR-3 adquirida de la ATCC, fueron
15 suspendidas en Matrigel (Becton, Dickinson and Company) y
subcutáneamente trasplantadas a cada ratón BALB/c-nu/nu
hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados
en el Día 25. El conjugado anticuerpo-fármaco (3), (4), (8),
o (9) fue intravenosamente administrado a una dosis de 3
20 mg/kg a la cola de cada ratón en el Día 25. Todos los
conjugados anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), y (9)
administrados, ejercieron un efecto inhibitorio del
crecimiento tumoral (Figura 20).

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

25 1×10^7 células de una línea celular de cáncer

gástrico humano NCI-N87 adquirida de la ATCC, fueron suspendidas en solución salina fisiológica y subcutáneamente trasplantadas a cada ratón BALB/c-nu/nu hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados en el Día 6. El conjugado anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), o (9) fue intravenosamente administrado a una dosis de 3 mg/kg a la cola de cada ratón en el Día 6. Todos los conjugados anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), y (9) administrados, ejercieron un efecto inhibitorio de crecimiento tumoral (Figura 21).

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

5×10^6 células de una línea celular cáncer pulmonar humano NCI-H292 adquirida de la ATCC, fueron suspendidas en solución salina fisiológica y subcutáneamente trasplantadas a cada ratón BALB/c-nu/nu hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados en el Día 9. El conjugado anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), o (9) fue intravenosamente administrado a una dosis de 3 mg/kg a la cola de cada ratón en el Día 9. Todos los conjugados anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), y (9) administrados, ejercieron un efecto inhibitorio de crecimiento tumoral (Figura 22).

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

3×10^6 células de una línea celular de cáncer humano de garganta FaDu adquirida de la ATCC, fueron

suspendidas en solución salina fisiológica y subcutáneamente trasplantada a cada ratón BALB/c-nu/nu hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados en el Día 11. El conjugado anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), o (9) fue intravenosamente administrado a una dosis de 3 mg/kg a la cola de cada ratón en el Día 11. Todos los conjugados anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), y (9) administrados, ejercieron un efecto inhibitorio de crecimiento tumoral (Figura 23).

10 21-1) Efecto antitumoral de ADC - (12)

 4 × 10⁶ células de una línea celular de adenocarcinoma pancreático humano CFPAC-1 adquirida de la ATCC, fueron suspendidas en solución salina fisiológica y subcutáneamente trasplantadas a cada ratón BALB/c-nu/nu hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados en el Día 14. El conjugado anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), o (9) fue intravenosamente administrado a una dosis de 3 mg/kg a la cola de cada ratón en el Día 14. Todos los conjugados anticuerpo-fármaco (3), (4), (8), y (9) administrados, ejercieron un efecto inhibitorio de crecimiento tumoral (Figura 24).

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

 CFPAC-1 fue subcutáneamente trasplantada a cada ratón BALB/c-nu/nu hembra de la misma manera que en el Ejemplo 21-1 (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente

agrupados en el Día 14. El conjugado anticuerpo-fármaco (8) o (13) fue intravenosamente administrado a una dosis de 1 mg/kg a la cola de cada ratón en el Día 14. Todos los conjugados anticuerpo-fármaco (8) o (13) administrados, 5 ejercieron un efecto inhibitorio de crecimiento tumoral (Figura 25).

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

3 $\times$ 10⁶ células de una línea celular de adenocarcinoma pancreático humano HPAC adquirida de la ATCC, 10 fueron suspendidas en solución salina fisiológica y subcutáneamente trasplantada a cada ratón BALB/c-nu/nu hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados en el Día 12. El conjugado anticuerpo-fármaco (8) o (13) fue intravenosamente administrado a una dosis de 3 mg/kg a la 15 cola de cada ratón en el Día 12. Todos los conjugados anticuerpo-fármaco (8) o (13) administrados, ejercieron un efecto inhibitorio de crecimiento tumoral (Figura 26).

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

Tejidos de cáncer esofágico humano obtenidos de la 20 Fundación de Ciencias de la Salud del Japón (Japan Health Sciences Foundation) fueron subcutáneamente trasplantados a cada ratón NOG (Instituto Central para Animales Experimentales) y se dejaron desarrollar. El injerto tumoral obtenido fue posteriormente trasplantado subcutáneamente a 25 cada ratón hembra NOD-scid (Charles River Laboratories Japan,

Inc.) (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados en el Día 27. El conjugado anticuerpo-fármaco (8) o (13) fue intravenosamente administrado a una dosis de 3 mg/kg a la cola de cada ratón en el Día 27. Ambos conjugados anticuerpo-fármaco (8) y (13) administrados, ejercieron un efecto inhibitorio de crecimiento tumoral (Figura 27).

Ejemplo 22: Evaluación del efecto inhibitorio del crecimiento tumoral de ADC

BxPC3, NCI-H292, NIH:OVCAR-3, CFPAC-1, FaDu, una línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano Calu-3 (ATCC), y una línea celular de cáncer de ovario humano CaOV3 (ATCC) como líneas células positivas al antígeno TROP2, y una línea celular de cáncer pulmonar humano Calu-6 (ATCC) y una línea celular de melanoma cutáneo humano A375 (ATCC) como líneas celulares negativas al antígeno TROP2, fueron utilizadas en la evaluación del efecto inhibitorio de crecimiento celular de cada ADC. BxPC3 y NCI-H292 fueron preparadas con el Medio RPMI1640 (Gibco) que contenía 10% de suero fetal bovino (Moregate Biotech), NIH:OVCAR-3 fue preparada con el medio RPMI1640 que contenía 20% de suero fetal bovino y 0.01 mg/ml de insulina (Invitrogen Corp.), CFPAC-1 fue preparada con el medio de Dulbecco Modificado de Iscove (Gibco) que contenía 10% de suero fetal bovino, FaDu, Calu-3, y Calu-6 fueron preparadas con el Medio Esencial Mínimo de Eagle (ATCC) que contenía 10% de suero fetal

bovino, y CaOV3 y A375 fueron preparadas con el Medio Eagle Modificado de Dulbecco (Gibco) que contenía 10% de suero fetal bovino, para cada una tenía 2.2×10^6 células/ml. Cada suspensión celular fue sembrada a 90 μ l/pozo a una microplaca de 96 pozos para el cultivo celular. El conjugado anticuerpo-fármaco (4) u (8) diluido con el Medio RPMI1640 hasta 100 nM, 20 nM, 4 nM, 0.8 nM, 0.16 nM, 0.032 nM, o 0.0064 nM, o el Medio RPMI1640 para comparación fueron agregados a ésta a 10 μ l/pozo, y las células fueron cultivadas bajo 5% de CO₂ a 37°C por 6 días. Después del cultivo, la microplaca fue retirada de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos. La solución de cultivo fue cargada con una cantidad igual del Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiterc-Glo (Promega) y se agitó por 10 minutos mediante el uso de un mezclador de placas. Después de la lisis celular, la intensidad de luminiscencia fue medida mediante el uso de un lector de placas.

La velocidad de inhibición del crecimiento celular después del cultivo por 6 días fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

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

a: Valor promedio de los pozos suplementados con la muestra después del cultivo por 6 días - Valor promedio de los pozos

no suplementados con la muestra al inicio del cultivo

b: Valor promedio proveniente de pozos suplementados con el medio, después del cultivo por 6 días - Valor promedio de los pozos no suplementados con el medio, al inicio del cultivo

5 El valor de GI_{50} fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

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

c: Concentración de muestra c

10 d: Concentración de muestra d

e: Velocidad de inhibición de crecimiento celular a la concentración de muestra c

f: Proporción de inhibición de crecimiento celular a la concentración de muestra d

15 Las concentraciones c y d establecen la relación $c > d$ que cruza la proporción de 50% de la inhibición del crecimiento celular.

Los conjugados anticuerpo-fármaco (4) y (8) mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento tumoral de $GI_{50} < 1$ (nM) sobre las líneas celulares positivas al antígeno TROP2, a saber, BxPC3, NCI-H292, NIH:OVCAR-3, CFPAC-1, FaDu, Calu-3, y CaOV3. Por otra parte, estos conjugados anticuerpo-fármaco no muestran efecto inhibitorio de crecimiento celular (> 100 (nM)) sobre las líneas celulares al antígeno-negativo TROP2, a saber Calu-6 y A375.

25

Texto Libre del Listado de Secuencias

SEQ ID NO: 1: Secuencia nucleotídica del cADN que codifica una región variable de cadena pesada del anticuerpo TINA1

SEQ ID NO: 2: Secuencia de aminoácido de la región variable
5 de cadena pesada del anticuerpo TINA1

SEQ ID NO: 3: Secuencia nucleotídica del cADN que codifica para una región variable de cadena ligera del anticuerpo TINA1

SEQ ID NO: 4: Secuencia de aminoácido de la cadena ligera
10 región variable del anticuerpo TINA1

SEQ ID NO: 5: Secuencia nucleotídica que codifica una señal de secreción de cadena κ humana y una región constante de cadena κ humana

SEQ ID NO: 6: Secuencia nucleotídica que codifica una señal
15 de secreción de cadena pesada humana y una región constante de IgG1 humana

SEQ ID NO: 7: Secuencia nucleotídica de una cadena pesada del anticuerpo cTINA1

SEQ ID NO: 8: Secuencia de aminoácido de la cadena pesada del
20 anticuerpo cTINA1

SEQ ID NO: 9: Secuencia nucleotídica de una cadena ligera del anticuerpo cTINA1

SEQ ID NO: 10: Secuencia de aminoácido de la cadena ligera del anticuerpo cTINA1

25 SEQ ID NO: 11: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-H1

- SEQ ID NO: 12: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-H1
- SEQ ID NO: 13: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-H2
- SEQ ID NO: 14: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-H2
- SEQ ID NO: 15: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-H3
- 5 SEQ ID NO: 16: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-H3
- SEQ ID NO: 17: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-L1
- SEQ ID NO: 18: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-L1
- SEQ ID NO: 19: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-L2
- SEQ ID NO: 20: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-L2
- 10 SEQ ID NO: 21: Secuencia de nucleótidos de hTINA1-L3
- SEQ ID NO: 22: Secuencia de aminoácidos de hTINA1-L3
- SEQ ID NO: 23: Secuencia de aminoácidos de CDRH1 del anticuerpo TINA1
- SEQ ID NO: 24: Secuencia de aminoácidos de CDRH2 del anticuerpo TINA1
- 15 SEQ ID NO: 25: Secuencia de aminoácidos de CDRH3 del anticuerpo TINA1
- SEQ ID NO: 26: Secuencia de aminoácidos de CDRL1 del anticuerpo TINA1
- 20 SEQ ID NO: 27: Secuencia de aminoácidos de CDRL2 del anticuerpo TINA1
- SEQ ID NO: 28: Secuencia de aminoácidos de CDRL3 del anticuerpo TINA1
- SEQ ID NO: 29: Secuencia de nucleótidos de una cadena pesada del anticuerpo hRS7
- 25

SEQ ID NO: 30: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo hRS7

SEQ ID NO: 31: Secuencia de nucleótidos de una cadena ligera del anticuerpo hRS7

5 SEQ ID NO: 32: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo hRS7

SEQ ID NO: 33: Cebador mG2aVR2

SEQ ID NO: 34: Cebador mKVR2

SEQ ID NO: 35: Cebador 3.3-F1

10 SEQ ID NO: 36: Cebador 3.3-R1

SEQ ID NO: 37: Cebador TINA1H-F

SEQ ID NO: 38: Cebador TINA1H-R

SEQ ID NO: 39: Cebador TINA1L-F

SEQ ID NO: 40: Cebador TINA1L-R

15 SEQ ID NO: 41: Cebador EG-Inf-F

SEQ ID NO: 42: Cebador EG1-Inf-R

SEQ ID NO: 43: Cebador CM-LKF

SEQ ID NO: 44: Cebador KCL-Inf-R.