

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035852**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.20

(21) Номер заявки
201500219

(22) Дата подачи заявки
2011.05.17

(51) Int. Cl. **C07K 16/30** (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛО ПРОТИВ TROP-2 ЧЕЛОВЕКА, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ IN VIVO**

(31) **2010-113302**

(32) **2010.05.17**

(33) **JP**

(43) **2015.10.30**

(62) **201291260; 2011.05.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛИВТЕХ, ИНК. (JP)

(72) Изобретатель:
**Накамура Кодзи, Окамура Кентаро,
Тамура Маки, Янаи Хироюки, Канке
Тору (JP)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2008144891
US-B2-7420041**

**ALBERTI Saverio et al. Biochemical
Characterization of Trop-2, a Cell Surface Molecule
Expressed by Human Carcinomas: Formal Proof
that the Monoclonal Antibodies T16 and Mov-16
Recognize Trop-2.HYBRIDOMA, 1992, Vol. 11, no. 5,
с. 539-545, реферат**

(57) Изобретение относится к выделенному антителу против TROP-2 человека, которое обладает противоопухолевой активностью in vivo; к выделенному фрагменту антитела, происходящему из указанного антитела; к гибридоме с номером доступа FERM BP-11251, продуцирующей указанное моноклональное антитело; к конъюгату антитела-лекарственное средство, который содержит указанное антитело и вещество, обладающее противоопухолевой активностью и/или активностью, вызывающей гибель клеток; к фармацевтической композиции для лечения опухоли, которая содержит антитело или фрагмент антитела или конъюгат; к лекарственному средству против опухоли, которое содержит антитело, фрагмент антитела или конъюгат; к средству для диагностики опухоли, которое содержит антитело или фрагмент антитела или конъюгат.

B1**035852****035852****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителу против TROP-2 человека, обладающему противоопухолевой активностью, и, в частности, к антителу против TROP-2 человека, обладающему противоопухолевой активностью *in vivo*. Кроме того, настоящее изобретение относится к гибридоме, которая продуцирует указанное выше антитело, и к применению указанного выше антитела.

Уровень техники

TROP-2 человека (Tacstd2, GA733-1 и EGP-1) (далее также обозначаемый как "hTROP-2") представляет собой однократно проходящий через мембрану белок клеточной мембраны типа 1, состоящий из 323 аминокислотных остатков (см. SEQ ID NO: 2), и известно, что этот белок сверхэкспрессируется в различных типах карцином эпидермальных клеток. Давно было сделано предположение о наличии белка клеточной мембраны, связанного с иммунологической устойчивостью, который обычно экспрессируется как в трофобластах человека, так и в злокачественных опухолях (непатентный документ 1). Была идентифицирована антигенная молекула, распознаваемая моноклональными антителами мыши (162-25.3, 162-46.2), реагирующими с белком клеточной мембраны клеточной линии хориокарциномы человека BeWo. Эта антигенная молекула рассматривалась в качестве одной из молекул, экспрессируемых в трофобластах человека, и она была названа Trop-2 (непатентный документ 2). После этого та же молекула была обнаружена другими исследователями. Таким образом, опухолевый антиген, распознаваемый моноклональным антителом мыши GA733, полученным иммунизацией клетками рака желудка SW94 8, был назван GA733-1 (непатентный документ 3), и гликопротеин эпителия, распознаваемый моноклональным антителом мыши RS7-3G11, полученным иммунизацией клетками немелкоклеточного рака легкого, был назван антигеном эпителия/карциномы EGP-1 (непатентный документ 4). В 1995 г. клонировали ген Trop-2, и в результате было подтверждено, что эти молекулы являются одинаковыми (непатентный документ 5). Более того, было установлено, что эта молекула имеет функцию усиления внутриклеточных сигналов кальция в злокачественных клетках (непатентный документ 6), и, таким образом, также ее называют связанным с опухолью трансдуктором сигнала кальция 2 (TACSTD2).

Ген hTROP-2 картирован на хромосоме 1p32, и он образует семейство генов TACSTD вместе с GA733-2, имеющим гомологию с ним приблизительно 50% (который известен как "TACSTD1", "эпителиальный гликопротеин EGP-2", "EpCAM" или "Trop-1") (непатентный документ 7). Белок hTROP-2 (323 аминокислотных остатка; SEQ ID NO: 2) имеет молекулярную массу приблизительно 36 кДа, и этот белок состоит из гидрофильного сигнального пептида (аминокислоты 1-26), внеклеточного домена (аминокислоты 27-274), трансмембранного домена (аминокислоты 275-297) и внутриклеточного домена (аминокислоты 298-323). Внеклеточный домен имеет четыре гетерогенных N-связанных участка гликозилирования и его кажущаяся молекулярная масса увеличивается на от 11 до 13 кДа вследствие добавления цепей сахаров (непатентный документ 5). Считается, что семейство генов TACSTD имеет характерную последовательность тиреоглобулинового повтора (TY) во внеклеточном домене и связано с пролиферацией, инвазией и метастазированием злокачественных клеток.

До настоящего времени был идентифицирован физиологический лиганд hTROP-2, и его молекулярная функция не установлена. Однако было описано, что hTROP-2 передает сигнал кальция в опухолевых клетках (непатентный документ 6). Кроме того, исходя из тех фактов, что внутриклеточный серин 303 фосфорилируется Ca^{2+} -зависимой протеинкиназой C (непатентный документ 4) и что hTROP-2 имеет связывающую PIP2 последовательность в его внутриклеточном домене, было предположено, что hTROP-2 имеет функцию передачи сигнала в опухолевых клетках (непатентный документ 8).

В результате диагностических исследований *in vitro*, таких как иммуногистохимия (ИHC) и проточно-цитометрический анализ, была описана сверхэкспрессия hTROP-2 во многих типах происходящих из эпителия карцином, таких как рак желудка, рак легкого, рак толстого кишечника, рак яичника, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак печени и рак пищевода. Напротив, экспрессия hTROP-2 в нормальных тканях ограничена клетками в эпителиальной области, и уровень экспрессии hTROP-2 в нормальных клетках является более низким, чем в злокачественных клетках. Таким образом, было сделано предположение о связи TROP-2 с образованием опухоли (патентные документы 1-3 и 9).

Более того, в анализе уровня экспрессии hTROP-2, использованного в качестве биомаркера в клинических образцах, было продемонстрировано, что, когда hTROP-2 экспрессируется в высокой степени, что коррелирует со злокачественностью рака толстого кишечника (непатентные документы 10 и 11), рака поджелудочной железы (непатентный документ 12) или рака ротовой полости (непатентный документ 13), возможность метастаза или рецидива такой опухоли является в значительной степени высокой. Более того, в анализе крупномасштабной экспрессии генов с использованием технологии микрочипов кДНК, hTROP-2 был идентифицирован в качестве кластера генов, который сверхэкспрессируется при наиболее высоком уровне в тяжелой папиллярной карциноме яичника, по сравнению с нормальным эпителием яичника (непатентный документ 14).

Более того, в последние годы была продемонстрирована важная роль hTROP-2 в образовании опухоли в моделях с использованием клеток рака толстого кишечника (непатентный документ 15). Поскольку экспрессия hTROP-2 стимулирует независимую от заякоривания пролиферацию опухолевых клеток и

требуется для образования опухоли и пролиферации злокачественных клеток, подкожно трансплантированных мышам с иммунодефицитом, это показало возможность того, что hTROP-2 может действовать в качестве функционального опухолевого антигена, и его можно использовать в качестве новой терапевтической мишени.

На сегодняшний день описаны исследования, касающиеся противоопухолевых эффектов нескольких антител против hTROP-2. Антитело RS7 (патентный документ 1) исследовали с использованием моделей *in vivo*, в которых использовали радиоактивно-меченые антитела, и была продемонстрирована противоопухолевая активность в моделях с ксенотрансплантатом у мышей *nude*. Однако не были описаны противоопухолевые эффекты антитела отдельно ("голое" антитело).

Кроме того, была описана цитотоксичность связанного с цитотоксином моноклонального антитела против hTROP-2 BR110 (патентный документ 2) в отношении клеточных линий злокачественной опухоли человека H3619, H2987, MCF-7, H3396 и H2981 в экспериментах *in vitro*. Однако не была описана цитотоксичность "голого" антитела или иммунного конъюгата BR110 *in vivo*.

В последние годы было описано, что выделенное моноклональное антитело, которое продуцировалось из клеточной линии гибридомы AR47A6.4.2 или AR52A301.5, полученной иммунизацией мышей тканями злокачественной опухоли яичника человека, связывалось с hTROP-2, и что впервые в качестве "голого" антитела оно проявляло противоопухолевую активность в моделях с ксенотрансплантатом на мышках *nude*, а также цитотоксичность *in vitro* (патентные документы 3 и 4). В этих патентных документах упомянутое выше антитело проявляло противоопухолевые эффекты при введении антитела отдельно или в моделях с ксенотрансплантатом на мышках, в которых трансплантировали клеточные линии рака поджелудочной железы ВхРС-3 и PL45, клеточную линию рака предстательной железы РС-3, клеточную линию рака молочной железы MCF-7 и клеточную линию рака толстого кишечника Colo205. Терапевтические эффекты антитела проявлялись в моделях, в которых трансплантировали клетки ВхРС-3. Исключая это, образование опухоли и пролиферация только частично (приблизительно на 40-60%) подавлялись предупреждающим введением антитела, и для такого подавления образования опухоли и пролиферации было необходимо чрезвычайно большое количество (приблизительно 20 мг/кг) антитела.

Исходя из упомянутых выше предшествующих открытий, было сделано предположение о потенциальном применении антитела против hTROP-2 в качестве противоопухолевого антитела. Однако не все из антител против hTROP-2 проявляют противоопухолевые эффекты при введении антитела отдельно в качестве "голых" антител *in vivo*. Антитела проявляют различные функции в отношении hTROP-2 в зависимости от участка связывания, аффинности и профиля моноклонального антитела.

Патентный документ 1: патент США № 6653104.

Патентный документ 2: патент США № 5840854.

Патентный документ 3: патент США № 7420040.

Патентный документ 4: патент США № 7420041.

Непатентный документ 1: Faulk W.P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75(4), pp. 1947-1951 (1978).

Непатентный документ 2: Lipinski M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78(8), pp. 5147-5150 (1981).

Непатентный документ 3: Linnenbach A.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86(1), pp. 27-31 (1989).

Непатентный документ 4: Basu A., et al., Int. J. Cancer, 62(4), pp. 472-479 (1995).

Непатентный документ 5: Fornaro M., et al., Int. J. Cancer, 62(5), pp. 610-618 (1995).

Непатентный документ 6: Ripani E., et al., Int. J. Cancer, 76(5), pp. 671-676 (1998).

Непатентный документ 7: Calabrese G., et al., Cell Genet, 92(1-2), pp. 164-165 (2001).

Непатентный документ 8: El Sewedy T. et al., Int. J. Cancer, 75(2), pp. 324-330 (1998).

Непатентный документ 9: Cubas R., et al., Biochim. Biophys. Acta., 1796(2), pp. 309-314 (2009).

Непатентный документ 10: Ohmachi T. et al., Clin. Cancer Res., 12(10), pp. 3057-3063 (2006).

Непатентный документ 11: Fang Y.J., et al., Int. J. Colorectal Dis., 24(8), pp. 875-884 (2009).

Непатентный документ 12: Fong D., et al., Br. J. Cancer, 99(8), pp. 1290-1295 (2008).

Непатентный документ 13: Fong D., et al., Mod. Pathol., 21(2), pp. 186-191 (2008).

Непатентный документ 14: Santin A.D., et al., Int. J. Cancer, 112(1), pp. 14-25 (2004).

Непатентный документ 15: Wang J., et al., Mol. Cancer Ther., 7(2), pp. 280-285 (2008).

Сущность изобретения

В связи с указанными выше обстоятельствами является желательной разработка антитела против hTROP-2 (моноклональное антитело против hTROP-2), имеющего высокую противоопухолевую активность *in vivo*, и, в частности, антитела против hTROP-2 или сходных с ним, которые обладают противоопухолевым эффектом в качестве "голого" антитела отдельно *in vivo* и, кроме того, которые обладают противоопухолевым эффектом в низкой дозе.

С учетом упомянутых выше обстоятельств было осуществлено настоящее изобретение. Настоящее изобретение относится к антителу против hTROP-2 (моноклональное антитело против hTROP-2), гибридоме, которая продуцирует антитело, фрагменту антитела, комплексу (иммуноконъюгату) антитела или сходных с ним и лекарственному средству, фармацевтической композиции для диагностики или лечения опухоли, способу детекции опухоли, набору для детекции или диагностики опухоли, и т.п., которые описаны ниже.

(1) Антитело против TROP-2 человека, которое обладает противоопухолевой активностью *in vivo*.

Примеры антитела согласно (1) выше включают антитело, проявляющее активность ингибирования роста опухоли 50% или более в дозировке 5-20 мг/кг массы тела; антитело, частота введения которого для того, чтобы оно проявляло активность ингибирования роста опухоли, составляет не более одного раза в неделю; антитело, проявляющее активность ингибирования роста опухоли 50% или более при однократном введении 10 мг/кг массы тела; антитело, обладающее противоопухолевой активностью в отношении двух или более типов клеточных линий опухоли человека; и антитело, имеющее константу диссоциации (величина K_d) $1,0 \times 10^{-10}$ М или менее. В рамках настоящего изобретения опухоль представляет собой опухоль, например, по меньшей мере одного типа, выбранного из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека, и, в частности, рак поджелудочной железы человека. Кроме того, опухоль также включает рецидивирующую злокачественную опухоль и метастазирующую злокачественную опухоль. Более того, опухолевая клеточная линия представляет собой опухоль, например, по меньшей мере двух типов, выбранных из группы, состоящей из клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-59, клеточной линии рака поджелудочной железы человека BxPC-3, клеточной линии рака поджелудочной железы человека KP-3L, клеточной линии рака поджелудочной железы человека KP-2, клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-1, клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-45H, клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-45P, клеточной линии рака поджелудочной железы человека TCC-PAN2, клеточной линии рака поджелудочной железы человека SUIT-2, клеточной линии рака толстого кишечника человека CACO-2, клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480, клеточной линии рака толстого кишечника человека DLD-1, клеточной линии рака толстого кишечника человека HCT 116, клеточной линии рака молочной железы человека JMT-1, клеточной линии рака молочной железы человека HCC1143, клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7, клеточной линии рака предстательной железы человека DU145 и клеточной линии рака предстательной железы человека PC-3; и, в частности, клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-59 и клеточной линии рака поджелудочной железы человека BxPC-3.

Примеры антитела согласно (1) выше включают

антитело, для которого аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи антитела представлены в SEQ ID NO: 36-38 соответственно, и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи антитела представлены в SEQ ID NO: 41-43 соответственно;

антитело, для которого аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи антитела представлены в SEQ ID NO: 46-48 соответственно, и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи антитела представлены в SEQ ID NO: 51-53 соответственно;

антитело, для которого аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи антитела представлены в SEQ ID NO: 56-58 соответственно, и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи антитела представлены в SEQ ID NO: 61-63 соответственно; и

антитело, для которого аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи антитела представлены в SEQ ID NO: 66-68 соответственно, и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи антитела представлены в SEQ ID NO: 71-73 соответственно.

Примером антитела согласно (1) выше является моноклональное антитело.

Примером антитела согласно (1) выше является генетически рекомбинантное антитело, и более конкретные примеры включают химерное антитело, гуманизированное антитело и антитело человека.

В настоящее описание примеры описанного выше химерного антитела включают

антитело, в котором V-область Н-цепи химерного антитела состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 35, и/или V-область L-цепи состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 40;

антитело, в котором V-область Н-цепи химерного антитела состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45, и/или V-область L-цепи состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 50;

антитело, в котором V-область Н-цепи химерного антитела состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 55, и/или V-область L-цепи состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 60; и

антитело, в котором V-область Н-цепи химерного антитела состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 65, и/или V-область L-цепи состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 70.

(2) Моноклональное антитело против TROP-2 человека, которое продуцируется гибридомой, имеющей номер доступа № FERM BP-11251, FERM BP-11252, FERM BP-11253, FERM BP-11346 или FERM BP-11254.

Примеры антитела согласно (1) и (2) выше включают антитело, которое связывается с участком, с которым связывается моноклональное антитело, продуцируемое гибридомой, имеющей номер доступа № FERM BP-11251, FERM BP-11252, FERM BP-11253, FERM BP-11346 или FERM BP-11254; и антитело, которое связывается с участком, содержащим по меньшей мере одну область (например, любую одну

область), выбранную из группы, состоящей из области, состоящей из аминокислот в положениях 43-65, области, состоящей из аминокислот в положениях 152-165, области, состоящей из аминокислот в положениях 171-183, области, состоящей из аминокислот в положениях 109-120, области, состоящей из аминокислот в положениях 43-56, и области, состоящей из аминокислот в положениях 193-206, в аминокислотной последовательности TROP-2 человека, представленной в SEQ ID NO: 2.

(3) Фрагмент антитела, происходящий из антитела согласно (1) или (2) выше.

Примеры фрагмента антитела согласно (3) выше включают

фрагмент антитела, содержащий аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 36-38, и/или аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 41-43, например фрагмент антитела, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, и/или аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;

фрагмент антитела, содержащий аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 46-48, и/или аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 51-53, например фрагмент антитела, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, и/или аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50;

фрагмент антитела, содержащий аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 56-58, и/или аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 61-63, например фрагмент антитела, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, и/или аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60; и

фрагмент антитела, содержащий аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 66-68, и/или аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 71-73, например фрагмент антитела, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, и/или аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70.

(4) Гибридома, которая продуцирует антитело согласно (1) или (2) выше.

(5) Гибридома, продуцирующая моноклональное антитело против TROP-2 человека, которая имеет номер доступа № FERM BP-11251, FERM BP-11252, FERM BP-11253, FERM BP-11346 или FERM ABP-11254.

(6) Конъюгат антитело-лекарственное средство, который содержит антитело согласно (1) или (2) выше и вещество, обладающее противоопухолевой активностью и/или активностью уничтожения клеток.

(7) Конъюгат антитело-лекарственное средство, который содержит антитело согласно (3) выше и вещество, обладающее противоопухолевой активностью и/или активностью уничтожения клеток.

Что касается конъюгата согласно (6) и (7) выше, опухоль представляет собой опухоль, например, по меньшей мере одного типа, выбранного из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека, и в частности, рака поджелудочной железы человека. Кроме того, опухоль также включает рецидивирующую злокачественную опухоль и метастазирующую злокачественную опухоль.

(8) Фармацевтическая композиция, которая содержит по меньшей мере один тип, выбранный из группы, состоящей из антитела согласно (1) и (2) выше, фрагмента антитела согласно (3) выше и конъюгата согласно (6) и (7) выше.

Примером композиции согласно (8) выше является композиция, используемая для лечения опухоли, и, в частности, композиция, которая не вызывает снижения массы тела в качестве побочного эффекта. Другим примером композиции является композиция, используемая для диагностики опухоли. В рамках настоящего изобретения опухоль представляет собой опухоль, например, по меньшей мере одного типа, выбранного из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека, и, в частности, рака поджелудочной железы человека. Кроме того, опухоль также включает рецидивирующую злокачественную опухоль и метастазирующую злокачественную опухоль.

(9) Лекарственное средство против опухоли, которое содержит по меньшей мере один тип, выбранный из группы, состоящей из антитела согласно (1) и (2) выше, фрагмента антитела согласно (3) выше и конъюгата согласно (6) и (7) выше.

Примером лекарственного средства согласно (9) выше является лекарственное средство, которое не вызывает снижения массы тела в качестве побочного эффекта.

(10) Средство для диагностики опухоли, которое содержит по меньшей мере один тип, выбранный из группы, состоящей из антитела согласно (1) и (2) выше, фрагмента антитела согласно (3) выше и конъюгата согласно (6) и (7) выше.

Что касается лекарственного средства согласно (9) выше и диагностического средства согласно (10) выше, опухоль представляет собой, например, по меньшей мере один тип опухоли, выбранный из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека, и, в частности, рака поджелудочной железы человека. Кроме того, опухоль также включает рецидивирующую злокачественную опухоль и метастазирующую злокачественную опухоль.

(11) Способ детекции опухоли, который включает обеспечение реакции по меньшей мере одного

типа, выбранного из группы, состоящей из антитела согласно (1) и (2) выше, фрагмента антитела согласно (3) выше и конъюгата согласно (6) и (7) выше, с образцом, взятым из живого организма; а затем детекцию сигнала(ов) вступившего в реакцию антитела и/или фрагмента антитела.

Что касается способа согласно (11) выше, опухоль представляет собой опухоль, например, по меньшей мере одного типа, выбранного из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека, и, в частности, рака поджелудочной железы человека. Кроме того, опухоль также включает рецидивирующую злокачественную опухоль и метастазирующую злокачественную опухоль.

(12) Набор для лечения, диагностики или детекции опухоли, который содержит по меньшей мере один тип, выбранный из группы, состоящей из антитела согласно (1) и (2) выше, фрагмента антитела согласно (3) выше и конъюгата согласно (6) и (7) выше.

Что касается набора согласно (12) выше, опухоль представляет собой опухоль, например, по меньшей мере одного типа, выбранного из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека, и, в частности, рака поджелудочной железы человека. Кроме того, опухоль также включает рецидивирующую злокачественную опухоль и метастазирующую злокачественную опухоль.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлено измерение аффинности связывания антигена (K_d : константа диссоциации) моноклонального антитела против hTROP-2 (K5-70). Abt: антитело (общее); Agf: антиген (свободный).

На фиг. 2 представлена реактивность культурального супернатанта гибридомы, продуцирующей моноклональное антитело против hTROP-2, в отношении клеток NuH-7 (TROP-2-негативные) и клеток NuH-7-hTROP-2. Закрашенная гистограмма указывает на клетки NuH-7, а незакрашенная гистограмма указывает на клетки NuH-7-hTROP-2.

На фиг. 3 представлена реактивность моноклонального антитела против hTROP-2 в отношении клеточной линии рака поджелудочной железы человека (клетки PK-59), которая эндогенно экспрессирует hTROP-2 на клеточной поверхности. Закрашенная гистограмма указывает на реакцию клеточной линии только с вторичным антителом (меченное PE антитело против IgG мыши), и незакрашенная гистограмма указывает на реакцию клеточной линии с каждым моноклональным антителом против hTROP-2.

На фиг. 4 представлена реактивность моноклонального антитела против hTROP-2 в отношении клеточной линии рака поджелудочной железы человека (клетки VxPC-3), которая эндогенно экспрессирует hTROP-2 на клеточной поверхности. Закрашенная гистограмма указывает на реакцию клеточной линии только с вторичным антителом (меченное PE антитело против IgG мыши), и незакрашенная гистограмма указывает на реакцию клеточной линии с каждым моноклональным антителом против hTROP-2.

На фиг. 5 представлена реактивность моноклонального антитела против hTROP-2 (K5-70) в отношении клеточных линий рака поджелудочной железы человека. Закрашенная гистограмма указывает на реакцию клеточной линии только с вторичным антителом (меченное PE антитело против IgG мыши), и незакрашенная гистограмма указывает на реакцию клеточной линии с каждым моноклональным антителом против hTROP-2.

На фиг. 6 представлена реактивность моноклонального антитела против hTROP-2 (K5-70) в отношении клеточных линий рака толстого кишечника человека (Colo320, CACO2, SW480, DLD1, CW2 и HTC 116), клеточных линий рака молочной железы человека (JIMT-1 и HCC1143) и клеточных линий рака предстательной железы человека (PC-3 и DU145). Закрашенная гистограмма указывает на реакцию клеточной линии только с вторичным антителом (меченное PE антитело против IgG мыши), и незакрашенная гистограмма указывает на реакцию клеточной линии с моноклональным антителом против hTROP-2.

На фиг. 7 представлена перекрестная реактивность моноклональных антител против hTROP-2 в отношении TROP-2 мыши. Использовали клетки, полученные путем обеспечения временной экспрессии гена TROP-2 мыши в клетках CHO-K1, и в качестве положительного контрольного антитела использовали антитело 12-102 (IgG1 мыши), проявляющее перекрестную реактивность с TROP-2 мыши. Закрашенная гистограмма указывает на реакцию клеточной линии только с вторичным антителом (меченное PE антитело против IgG мыши), и незакрашенная гистограмма указывает на реакцию клеточной линии с каждым моноклональным антителом против hTROP-2.

На фиг. 8 представлена перекрестная реактивность моноклональных антител против hTROP-2 в отношении EpCAM/TROP-1 человека. Использовали клетки, полученные путем обеспечения временной экспрессии гена EpCAM/TROP-1 человека в клетках CHO-K1, и в качестве положительного контрольного антитела использовали меченное PE моноклональное антитело против EpCAM человека (Becton, Dickinson and Company). Закрашенная гистограмма указывает на реакцию клеточной линии только с вторичным антителом (меченное PE антитело против IgG мыши), и незакрашенная гистограмма указывает на реакцию клеточной линии с каждым моноклональным антителом против hTROP-2.

На фиг. 9 представлена активность ингибирования роста клеток антител против hTROP-2 (T6-16, T5-86, K5-70 и K5-107) в отношении клеточной линии рака поджелудочной железы человека (клетки PK-59). mIgG указывает на контрольное антитело (IgG мыши), и YY01 указывает на коммерчески доступное

антитело против hTROP-2 (Santa Cruz). Белый столбец: 0 мкг/мл; серый столбец: 0,1 мкг/мл; черный столбец: 1 мкг/мл. Уровень активности выражали в качестве отношения к величине в случае, когда антитело не добавляли (0 мкг/мл). Планка погрешности указывает на стандартное отклонение. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 10 представлен анализ застания царапины клеточной линии рака поджелудочной железы человека (клетки PK-59) в присутствии антител против hTROP-2 (T6-16 и K5-70).

На фиг. 10А представлены характерные примеры фотографий областей царапин для клеток PK-59. 0 сутки демонстрируют типичный пример сразу после нанесения царапины. Для mIgG (1 сутки) продемонстрирована фотография, полученная через 1 сутки (24 ч) после нанесения царапины, а затем добавления контрольного антитела (IgG мыши, 1 мкг/мл) в среду. Для K5-70 (1 сутки) продемонстрирована фотография, полученная через 1 сутки (24 ч) после нанесения царапины, а затем добавления антитела K5-70 (1 мкг/мл) в среду. Для T6-16 (1 сутки) продемонстрирована фотография, полученная через 1 сутки (24 ч) после нанесения царапины, а затем добавления антитела T6-16 (1 мкг/мл) в среду. Каждая стрелка на каждой фотографии указывает на ширину области царапины.

Фиг. 10В. Площадь области царапины анализируют с использованием программного обеспечения для анализа изображений (Scion Image), и на основе полученной величины вычисляли величины для различных типов других образцов с использованием группы добавления контрольного mIgG на 0 сутки в качестве стандартной величины, равной 1. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 11 представлен FACS-анализ с использованием маркера стволовых клеток, который проводили в отношении клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-59. На фиг. 11А представлено изображение, иллюстрирующее FACS, демонстрирующий экспрессию EpCAM в клетках PK-59. Закрашенная гистограмма указывает на реакцию клеток только с вторичным антителом (меченное PE антитело против IgG мыши), и незакрашенная гистограмма указывает на реакцию клеток с антителом против EpCAM человека (Becton, Dickinson and Company). На фиг. 11В и С представлены изображения, иллюстрирующие FACS, демонстрирующий экспрессию Р-гликопротеина/MCR1 клеток PK-59 (фиг. 11В), или экспрессию ABCG2 в клетках PK-59 (фиг. 11С). Синяя гистограмма показывает реакцию клеток только с вторичным антителом, а красная гистограмма указывает на реакцию клеток с антителом против Р-гликопротеина/MDR1 человека (BD Biosciences Pharmingen) (фиг. 11В), или с антителом против ABCG2 человека (BD Biosciences Pharmingen) (фиг. 11С). На фиг. 11D представлен FACS-анализ, в котором клетки PK-59 подвергали двойному окрашиванию маркерами стволовых клеток рака поджелудочной железы: меченным FITC антителом против CD24 человека (BD Biosciences Pharmingen) и меченым PE антителом против CD44 человека (BD Biosciences Pharmingen). Каждое число на фиг. 11D указывает на имеющееся соотношение клеток в каждой фракции.

На фиг. 12 представлена оценка противоопухолевой активности нового клона моноклонального антитела против hTROP-2 K5-70 (IgG2a мыши) в отношении ксенотрансплантатов в моделях лечения с использованием клеток PK-59.

На фиг. 12А представлен рост опухоли с течением времени в контрольной группе (IgG мыши) и группе введения K5-70 (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка указывает на период введения антитела. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 12В представлена нанесенная на график масса опухоли каждой мыши в момент времени 21 сутки (сутки 21) (последний день эксперимента) в тесте на фиг. 12А. Числовая величина на каждом графике указывает на среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. ** $P < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 13 представлена оценка противоопухолевой активности клона K5-107 (А), клона T6-16 (В) и клона K5-116-2-1 (С) в отношении ксенотрансплантатов в моделях лечения с использованием клеток PK-59. Обозначение "●" указывает на контрольную группу (IgG мыши), и обозначение "○" указывает на группу введения антитела против hTROP-2. Стрелка на графике указывает на период введения антитела, и пронумерованная величина на каждой графике указывает на среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * $P < 0,05$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 14 представлена оценка противоопухолевой активности клона K5-107 (А), клона T6-16 (В) и клона K5-116-2-1 (С) в отношении ксенотрансплантатов в моделях предупреждения с использованием клеток PK-59. Обозначение "●" указывает на контрольную группу (IgG мыши), и обозначение "○" указывает на группу введения антитела против hTROP-2. Стрелка на графике указывает на период введения антитела, и пронумерованная величина на каждой графике указывает на среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * $P < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 15 представлена оценка противоопухолевой активности клона K5-70 в отношении ксенотрансплантатов в моделях предупреждения и лечения с использованием клеток VxPC-3. На фиг. 15А представлен рост опухоли с течением времени в контрольной группе (IgG мыши) и в группе введения K5-70 в моделях предупреждения (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка указывает на период введения антитела. ** $P < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента). На фиг. 15В представлен рост опухоли с течением времени в контрольной группе (IgG мыши) и в группе введения K5-70 в моделях лечения (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка указывает на период введения антитела.

* $P < 0,05$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 16 представлена дозозависимая противоопухолевая активность клона K5-70 в отношении ксенотрансплантатов в моделях предупреждения с использованием клеток РК-59. Объем опухоли выражен в качестве среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

На фиг. 16А представлен рост опухоли с течением времени в контрольной группе и в группах введения K5-70 при различных дозах (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка указывает на период введения антитела. * $P < 0,05$ (согласно t-критерию Стьюдента), ** $P < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 16В представлена нанесенная на график масса опухоли каждой мыши в момент времени 17 суток (сутки 17) (последний день эксперимента) в испытании фиг. 16А. Число на каждом графике указывает на среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. ** $P < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 17 представлено схематическое изображение химерного белка TROP-2 человека/мыши. SP - сигнальная последовательность; домен TY - область тироглобулина 1 типа; TM - трансмембранная область; C - внутриклеточная область, где закрашенная область представляет собой полипептид, происходящий из hTROP-2, в то время как незакрашенная область представляет собой полипептид, происходящий из TROP-2 мыши. Число в верхнем положении схематического изображения химерного белка указывает на номер аминокислоты белка TROP-2 мыши, а номер в его нижнем положении указывает на номер аминокислоты белка hTROP-2.

На фиг. 18 представлены результаты, полученные путем идентификации связывающей области моноклонального антитела против hTROP-2 с использованием химерного TROP-2 человека/мыши. С использованием клеток HEK293, которые постоянно экспрессируют либо химерный белок TROP-2-С человека/мыши (hmTROP-2-С), либо химерный белок TROP-2-D мыши/человека (hmTROP-2-D), исследовали реактивность в отношении моноклональных антител против hTROP-2, представленных на фигуре. В качестве отрицательного контроля использовали IgG2b.

На фиг. 19 представлены результаты, полученные путем идентификации связывающей антителом области моноклонального антитела против hTROP-2.

Ген hTROP-2 и каждый химерный ген TROP-2 человека/мыши вводили в клетки HEK293, а затем с использованием клеток, в которых временно экспрессировались гены, проводили FACS-анализ. На фиг. 19(А) представлены результаты исследования реактивности антител K5-70, K5-107, T5-86 и K5-116-2-1 в отношении hTROP-2 (верхняя строка), hmTROP-2-A (средняя строка) и hmTROP-2-B (нижняя строка). В качестве отрицательного контроля использовали IgG2b мыши. На фиг. 19В представлены результаты исследования реактивности антител T6-4 и T6-16 в отношении hTROP-2 (верхняя строка), hmTROP-2-A (средняя строка) и hmTROP-2-B (нижняя строка). В качестве отрицательного контроля использовали IgG2b мыши.

На фиг. 20 представлена экспрессия hTROP-2 в нормальных тканях человека. Наборы нормальных тканей человека подвергали иммунному окрашиванию моноклональным антителом против hTROP-2 клона K5-63-17. (А) кожа, (В) пищевод, (С) почка (кора), (D) почка (мозговое вещество), (Е) поджелудочная железа, (F) предстательная железа, (G) мочевого пузыря, (H) миндалевидная железа, (I) сердце, (J) печень (увеличение: $\times 200$).

На фиг. 21 представлена экспрессия hTROP-2 в злокачественных тканях. Наборы злокачественных тканей человека подвергали иммунному окрашиванию моноклональным антителом против hTROP-2 клона K5-63-17. (А) рак молочной железы, (В) рак легкого, (С) рак пищевода, (D) рак желудка, (Е) рак поджелудочной железы, (F) рак толстого кишечника, (G) рак мочевого пузыря, (H) рак предстательной железы, (I) рак яичника (увеличение: $\times 100$).

На фиг. 22 представлена противоопухолевая активность клона K5-70 при однократном введении в отношении ксенотрансплантатов в моделях предупреждения с использованием клеток РК-59.

На фиг. 22А представлено образование опухоли с течением времени в контрольной группе (IgG мыши ●) и в группе введения K5-70 (○) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка указывает на введение антитела. * $P < 0,05$ (согласно t-критерию Стьюдента), ** $P < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 22В представлена нанесенная на график масса каждой мыши в момент времени 28 суток (28 суток) (последний день эксперимента) в испытании согласно фиг. 22А. ** $P < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 22С представлено образование опухоли с течением времени у каждой мыши в контрольной группе (IgG мыши ●) и в группе введения K5-70 (○). Стрелка указывает на введение антитела.

На фиг. 23 представлена противоопухолевая активность клона K5-70 в отношении ксенотрансплантатов в моделях лечения с использованием клеток рака толстого кишечника человека SW480.

На фиг. 23А представлено образование опухоли с течением времени в контрольной группе (IgG мыши ●) и в группе введения K5-70 (○) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка указывает на период введения антитела. ** $P < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 23В представлена нанесенная на график масса каждой мыши в момент времени 44 сутки (сутки 44) (последний день эксперимента) в испытании согласно фиг. 23А. ** $P < 0,01$ (согласно t-

критерию Стьюдента).

На фиг. 24 представлена противоопухолевая активность клона K5-116-2-1 в отношении ксенотрансплантатов в моделях лечения с использованием клеток SW480.

На фиг. 24А представлено образование опухоли с течением времени в контрольной группе (IgG мыши ●) и в группе введения T6-16 (○) (среднее значение±стандартное отклонение). Стрелка указывает на период введения антитела. $**P<0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 24В представлена нанесенная на график масса опухоли каждой мыши в момент времени 42 сутки (сутки 42) (последний день эксперимента) в испытании согласно фиг. 24А. $**P<0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 25 представлена противоопухолевая активность клона T6-16 в отношении ксенотрансплантатов в моделях лечения с использованием клеток SW480.

На фиг. 25А представлено образование опухоли с течением времени в контрольной группе (IgG мыши ●) и в группе введения T6-16 (○) (среднее значение±стандартное отклонение). Стрелка указывает на период введения антитела. $*P<0,05$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 25В представлена нанесенная на график масса опухоли каждой мыши в момент времени 42 сутки (сутки 42) (последний день эксперимента) в испытании согласно фиг. 25А. $*P<0,05$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 26 представлена дозозависимая противоопухолевая активность клона K5-70 в отношении ксенотрансплантатов в моделях лечения с использованием клеток SW480.

На фиг. 26А представлено образование опухоли с течением времени в контрольной группе (IgG мыши ●) и в группе введения K5-70 (○: 1 мг/кг, △: 5 мг/кг, □: 10 мг/кг) (среднее значение±стандартное отклонение). Стрелка указывает на период введения антитела. $*P<0,05$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 26В представлена нанесенная на график масса опухоли каждой мыши в момент времени 42 сутки (сутки 42) (последний день эксперимента) в испытании согласно фиг. 26А. $*P<0,05$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 27 представлена противоопухолевая активность клона K5-70 в отношении ксенотрансплантатов в моделях лечения с использованием клеток SW480.

На фиг. 27А представлена противоопухолевая активность антитела K5-70 при интервалах введения один раз в неделю. Представлено образование опухоли с течением времени в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения K5-70 (○: 10 мг/кг) (среднее значение±стандартное отклонение). Стрелки-указатели (сутки 10, 17, 24, 31 и 38) указывают на введение антитела K5-70. $*P<0,05$ согласно t-критерию Стьюдента.

На фиг. 27В представлено образование опухоли с течением времени путем введения антитела K5-70 с интервалами введения один раз в десять суток (■: q10d) или один раз каждые две недели (●: q14d). Закрашенный круг (◇) указывает на контрольную группу (IgG мыши, 10 мг/кг) (среднее значение±стандартное отклонение). Закрашенные стрелки-указатели (▼: сутки 9, 19 и 29) и незакрашенные стрелки-указатели (▽: сутки 9, 23 и 37) указывают на введение антитела K5-70. $*P<0,05$, $**P<0,01$ согласно t-критерию Стьюдента.

На фиг. 28 представлена дозозависимая противоопухолевая активность клона T6-16 в отношении ксенотрансплантатов в моделях лечения с использованием клеток SW480.

На фиг. 28А представлено образование опухоли с течением времени в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения T6-16 (○: 1 мг/кг, △: 5 мг/кг, □: 10 мг/кг) (среднее значение±стандартное отклонение). Стрелка указывает на период введения антитела. $**P<0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 28В представлена нанесенная на график масса опухоли каждой мыши в момент времени 43 сутки (сутки 43) (последний день эксперимента) в испытании согласно фиг. 28А. $**P<0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 29 представлена противоопухолевая активность клона T6-16 в отношении ксенотрансплантата в моделях лечения с использованием клеток SW480. Представлено образование опухоли с течением времени в контрольной группе (●: IgG мыши, 10 мг/кг) и в группе введения T6-16 (10 мг/кг) (○: q7d, △: q10d) (среднее значение±стандартное отклонение). Концы стрелок (сутки 10, 17, 24, 31 и 38) и стрелки (сутки 10, 20, 30 и 40) указывают на введение антитела T6-16. В контрольной группе введение проводили один раз в трое суток. $*P<0,05$, $**P<0,01$ согласно t-критерию Стьюдента.

На фиг. 30 представлена противоопухолевая активность клона K5-70 в отношении ксенотрансплантата в моделях предупреждения с использованием клеток предстательной железы человека DU-145.

На фиг. 30А представлено образование опухоли с течением времени в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения K5-70 (○) (среднее значение±стандартное отклонение). Стрелка указывает на период введения антитела. $*P<0,05$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 30В представлена нанесенная на график масса опухоли каждой мыши в момент времени 40 сутки (сутки 40) (последний день эксперимента) в испытании согласно фиг. 30А. $*P<0,05$ (согласно t-критерию Стьюдента).

На фиг. 31 представлена активность ингибирования метастазирования клона K5-70 в моделях метастазов в печень с использованием клеток РК-59.

На фиг. 31А и 31В представлено изображение вырезанной печени в случае контрольной группы (IgG мыши) (А) и группы введения K5-70 (В), которое было получено через 6 недель после трансплантации клеток. Стрелки указывают на очаги метастазирования в печень.

На фиг. 32 представлена противоопухолевая активность K5-70 в моделях с ксенотрансплантатами с использованием клеток SW480, которые представляют собой модели рецидивирующей злокачественной опухоли после введения иринотекана гидрохлорида. На этой фигуре представлено образование опухоли с течением времени в группе без введения (◆), в группе введения иринотекана гидрохлорида (40 мг/кг)+K5-70 (○: 10 мг/кг) и в группе введения иринотекана гидрохлорида (40 мг/кг)+IgG мыши (●: 10 мг/кг) (среднее значение±стандартное отклонение). Стрелки-указатели (сутки 11, 14 и 17) указывают на введение иринотекана гидрохлорида. Антитело K-70 или IgG мыши вводили один раз каждые трое суток, начиная с 20 суток. Стрелка указывает на период введения антитела. *P<0,05, **P<0,01 согласно t-критерию Стьюдента.

На фиг. 33 представлена нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области Н-цепи (VH) клона K5-70 (SEQ ID NO: 34) и установленная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 35). Сигнальный пептид указан курсивом. Глутамин (Q), подчеркнутый двойным подчеркиванием, указывает на N-концевой аминокислотный остаток зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; IYWIN, NIYPSDSYTNYNQKFKD и TSMADY) определяли в соответствии с определениями Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 клона K5-70 VH представлены в SEQ ID NO: 36-38 соответственно.

На фиг. 34 представлена нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области L-цепи (VL) клона K5-70 (SEQ ID NO: 39) и установленная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 40). Сигнальный пептид показан курсивом. Аспарагиновая кислота (D), подчеркнутая двойным подчеркиванием, указывает на N-концевой аминокислотный остаток зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; RASQSIGTSIH, YASESIS и QQSNSWPFT) определяли в соответствии с определениями Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона K5-70 представлены в SEQ ID NO: 41-43 соответственно.

На фиг. 35 представлена нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области Н-цепи (VH) клона K5-107 (SEQ ID NO: 44) и установленная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 45). Сигнальный пептид представлен курсивом. Глутамин (Q), подчеркнутый двойным подчеркиванием, указывает на N-концевой аминокислотный остаток зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; SYWMH, NIYPGGGYTNYDEKFKS и SSVFDY) определяли в соответствии с определениями Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VH клона K5-107 представлены в SEQ ID NO: 46-48 соответственно.

На фиг. 36 представлена нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области L-цепи (VL) клона K5-107 (SEQ ID NO: 49) и установленная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 50). Сигнальный пептид показан курсивом. Аспарагиновая кислота (D), подчеркнутая двойным подчеркиванием, указывает на N-концевой аминокислотный остаток зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; RASQNIQTSIH, YASESIS и QQSNSWPFT) определяли в соответствии с определениями Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона K5-107 представлены в SEQ ID NO: 51-53 соответственно.

На фиг. 37 представлена нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области Н-цепи (VH) клона K5-116-2-1 (SEQ ID NO: 54) и установленная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 55). Сигнальный пептид представлен курсивом. Глутамин (Q), подчеркнутый двойным подчеркиванием, указывает на N-концевой аминокислотный остаток зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; SYWIT, NIYPSDSYTNYNQKFRD и LFDY) определяли в соответствии с определениями Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VH клона K5-116-2-1 представлены в SEQ ID NO: 56-58 соответственно.

На фиг. 38 представлена нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области L-цепи клона K5-116-2-1 (VL) (SEQ ID NO: 59) и установленная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 60). Сигнальный пептид показан курсивом. Аспарагиновая кислота (D), подчеркнутая двойным подчеркиванием, указывает на N-концевой аминокислотный остаток зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; RASQSIGTSIH, YASESIS и QQSNSWPFT) определяли в соответствии с определениями Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона K5-116-2-1 представлены в SEQ ID NO: 61-63 соответственно.

На фиг. 39 представлена нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области Н-цепи (VH) клона Т6-16 (SEQ ID NO: 64) и установленная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 65). Сигнальный пептид представлен курсивом. Глутаминовая кислота (E), подчеркнутая двойным подчеркиванием, указывает на N-концевой аминокислотный остаток зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; DYNMH, YIYPYNGGTGYNQRFKS и EDYGSSPSYAMDY) определяли в соответствии с определениями Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VH клона Т6-16 представлены в SEQ ID NO: 66-68 соответственно.

На фиг. 40 представлена нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области L-цепи клона Т6-16 (VL) (SEQ ID NO: 69) и установленная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 70). Сигнальный пептид показан курсивом. Аспарагиновая кислота (D), подчеркнутая двойным подчеркиванием, указывает на N-концевой аминокислотный остаток зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; RSSQLVHGNGNTYLH, KVSNRFS и SQTTHVPT) определяли в соответствии с определениями Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона Т6-16 представлены в SEQ ID NO: 71-73 соответственно.

Способ осуществления изобретения

Далее настоящее изобретение описано подробно.

Представленное ниже описание не предназначено для ограничения объема настоящего изобретения. Помимо представленных ниже примеров, настоящее изобретение можно модифицировать и осуществлять соответствующим образом в диапазоне, который не ухудшает замысла настоящего изобретения.

Настоящее описание включает все содержимое описания заявки на патент Японии № 2010-113302 (поданной 17 мая 2010 г.), которая является приоритетным документом для настоящей заявки.

Кроме того, все публикации, цитированные в настоящем описании, которые включают документы уровня техники и патентные документы, такие как выложенные публикации заявок и публикации патентов, включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

1. Сущность настоящего изобретения.

Как указано выше, TROP-2 человека (hTROP-2) представляет собой однократно проходящий через мембрану мембранный белок 1 типа, имеющий полную длину 323 аминокислотных остатка. Известно, что ген hTROP-2 и его продукт экспрессируются в различных типах злокачественных опухолей.

Как упоминалось выше, является желательной разработка антитела против hTROP-2 человека (моноклональное антитело против hTROP-2 человека) или сходных с ним, имеющего высокую противоопухолевую активность *in vivo*. В таких обстоятельствах автор настоящего изобретения провел скрининг чрезвычайно большого количества клонов и в результате автор изобретения успешно получил клон, обладающий высокой противоопухолевой активностью *in vivo*. В частности, настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, которое специфично распознает внеклеточную область hTROP-2 *in vivo*, и, в частности, к моноклональному антителу, проявляющему высокую аффинность пикомолярного (пМ) порядка. Антитело по настоящему изобретению чрезвычайно пригодно в том, что оно представляет собой моноклональное антитело против hTROP-2, которое проявляет значительную активность ингибирования роста опухоли при более низкой дозе, чем доза существующего антитела против hTROP-2 (например, при дозировке 1/20), когда его вводят отдельно в качестве "голого" антитела, и которое также проявляет значительную активность ингибирования роста опухоли в моделях лечения имеющих опухоли мышей, в которых используют множество типов злокачественных клеток человека.

2. Получение антитела против hTROP-2.

(1) Получение антитела.

Информация, касающаяся аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 2) hTROP-2, описана под "номером доступа NP_002344" на web-сайте, например NCBI (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Информация, касающаяся нуклеотидной последовательности (SEQ ID NO: 1), кодирующей аминокислотную последовательность hTROP-2, описана под "номером доступа NM 002353" на web-сайте, описанном выше.

В качестве антигена можно использовать полипептид или пептид (который также называют просто пептидом), содержащий по меньшей мере часть (всю или часть) аминокислотной последовательности hTROP-2, и предпочтительно можно использовать пептид, содержащий по меньшей мере часть (всю или часть) аминокислотной последовательности внеклеточной области hTROP-2. Внеклеточная область (включая сигнальный пептид) hTROP-2 указывает на область, содержащую аминокислоты в положениях 1-274 из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 (сигнальный пептид: аминокислоты в положениях 1-26). В настоящем описании, что касается пептида, используемого в качестве антигена, представленное выше описание "по меньшей мере часть аминокислотной последовательности" конкретно не ограничено с точки зрения длины. Например, предпочтительными являются область, содержащая аминокислоты в положениях 1-145 из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, область, содержащая аминокислоты в положениях 146-274 из той же аминокислотной последовательности, что описана выше и т.п.

Пептид, используемый в качестве антигена, можно получать либо путем химического синтеза, либо способом генетической инженерии с использованием *Escherichia coli* или сходных с ними. Можно использовать способ, хорошо известный специалистам в данной области.

Когда пептид получают путем химического синтеза, его можно синтезировать хорошо известным способом пептидного синтеза. Кроме того, для синтеза пептидов можно использовать как способ твердофазного синтеза, так и способ жидкофазного синтеза. Также можно использовать коммерчески доступное устройство для синтеза пептидов (например, PSSM-8, изготовленное Shimadzu Corporation, и т.д.).

Когда пептид синтезируют способом генетической инженерии, сначала конструируют и синтезируют ДНК, кодирующую пептид. Конструирование и синтез такой ДНК можно проводить в соответствии со способом ПЦР с использованием вектора, содержащего полноразмерный ген hTROP-2 или сходный с ним в качестве матрицы, и также с использованием праймеров, сконструированных так, чтобы они были способны синтезировать желаемую область ДНК. После этого ДНК лигируют в подходящий вектор с получением рекомбинантного вектора, используемого для экспрессии белка, а затем этот рекомбинантный вектор встраивают в хозяина, так чтобы представляющий интерес ген мог экспрессироваться в нем, тем самым получая трансформант (Sambrook J. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

В качестве вектора используют фаг или плазмиду, способные автономно реплицироваться в микроорганизме-хозяине. Кроме того, также можно использовать вирус животного или вирусный вектор насекомого. Для получения рекомбинантного вектора очищенную ДНК можно расщеплять подходящими ферментами рестрикции, а затем отщепленную таким образом часть ДНК можно встраивать в участок фермента рестрикции или сходные с ним в ДНК подходящего вектора, так чтобы он лигировался в вектор. Тип хозяина, используемого для трансформации, конкретно не ограничен, при условии, что он способен экспрессировать представляющий интерес ген. Примеры такого хозяина включают бактерии (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и т.д.), дрожжи, клетки животного (клетки COS, клетки CHO и т.д.), клетки насекомого и насекомых. Также в качестве такого хозяина можно использовать млекопитающее, такое как коза. Способ введения рекомбинантного вектора в хозяина является общеизвестным.

Описанный выше трансформант культивируют, а затем из культуры собирают пептид, используемый в качестве антигена. Термин "культура" используют в настоящем описании для обозначения как (a) культурального супернатанта, так и (b) культивируемых клеток, культивируемой клеточной массы или продукта их разрушения.

После завершения культивирования, когда представляющий интерес пептид продуцируют в клеточной массе или в клетках, пептид экстрагируют путем разрушения клеточной массы или клеток. С другой стороны, когда представляющий интерес пептид продуцируется вне клеточной массы или вне клеток, культуральный раствор используют прямо или клеточную массу, или клетки извлекают из культурального раствора путем центрифугирования, или сходных с ним. После этого представляющий интерес пептид можно выделять и очищать путем однократного применения биохимических способов, широко используемых при выделении и очистке пептидов, таких как осаждение с сульфатом аммония, гель-фильтрация, ионообменная хроматография и аффинная хроматография, или путем комбинирования надлежащим образом упомянутых выше биохимических способов.

В настоящем изобретении пептид, используемый в качестве антигена, также можно получать путем трансляции *in vitro* с использованием бесклеточной системы для синтеза. В этом случае можно использовать два способа, а именно способ с использованием РНК в качестве матрицы и способ с использованием ДНК в качестве матрицы (транскрипция/трансляция). В качестве такой системы для бесклеточного синтеза можно использовать коммерчески доступную систему, такую как система Expressway™ (Invitrogen), PURESYSYSTEM (зарегистрированный торговый знак; Post Genome Institute) или систему TNT (зарегистрированный торговый знак; Promega).

Полученный таким образом пептид может связывать подходящий белок-носитель, такой как бычий сывороточный альбумин (BSA), гемоцианин лимфы улитки (KLH), тиреоглобулин человека или γ -глобулин куры.

Более того, антиген может представлять собой пептид, состоящий из аминокислотной последовательности, содержащей делецию, замену или вставку одной или нескольких аминокислот относительно аминокислотной последовательности hTROP-2 (SEQ ID NO: 2) или ее неполной последовательности, как описано выше. Например, можно использовать пептид, состоящий из аминокислотной последовательности, в которой одна или более (предпочтительно одна или несколько (например, 1-10 и более предпочтительно 1-5)) аминокислот удалены, или одна или более (предпочтительно одна или несколько (например, 1-10 и более предпочтительно 1-5)) аминокислот заменены другими аминокислотами, или одна или более (предпочтительно одна или несколько (например, 1-10 и более предпочтительно 1-5)) других аминокислот добавлены, относительно аминокислотной последовательности hTROP-2 или его неполной последовательности.

В настоящем изобретении ген, подлежащий введению в клетку или сходные с ней, представляет собой ген, кодирующий белок hTROP-2 или его частичный фрагмент, или его мутантный белок или его фрагмент. В качестве такого гена можно использовать, например, ген, имеющий нуклеотидную последо-

вательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или ее неполную последовательность.

Более того, в качестве гена, подлежащего введению в клетку или сходные с ней, также можно использовать нуклеотидную последовательность, гибридизующуюся в жестких условиях с последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, и кодирующую белок, обладающий активностью hTROP-2, или ее неполную последовательность.

Название "жесткие условия" используют в настоящем описании для обозначения условий промывания после завершения гибридизации. В качестве таких жестких условий концентрация соли (натрия) в буфере составляет от 10 до 500 мМ и температура составляет от 42 до 72°C и предпочтительно указанное выше условие содержания соли представляет собой от 50 до 300 мМ и температура составляет от 55 до 68°C.

Мутацию можно вносить в ген известным способом, таким как способ Kunkel или способ дуплекса с разрывами, с использованием, например, набора для внесения мутаций, в котором используется сайт-направленный мутагенез, такого как система для сайт-направленного мутагенеза GeneTailor™ (изготовленная Invitrogen) или система для сайт-направленного мутагенеза TaKaRa (Mutan-K, Mutan-Super Express Km, и т.д.; изготовленная Takara Bio Inc.).

(2) Получение поликлонального антитела.

Полученный антиген вводят млекопитающему для иммунизации. Тип такого млекопитающего конкретно не ограничен. Например, можно использовать крысу, мышь и кролика, и среди них предпочтительной является мышь.

Дозировку антигена на животное можно определять соответствующим образом в зависимости от присутствия или отсутствия адъюванта. Примеры такого адъюванта включают полный адъювант Фрейнда (FCA), неполный адъювант Фрейнда (FIA) и адъювант на основе гидроксида алюминия. Иммунизацию можно проводить, главным образом, путем инъекции антигена в вену, подушечку лапы, в подкожный слой или брюшную полость животного. Кроме того, интервал иммунизации конкретно не ограничен и иммунизацию проводят с интервалами от нескольких суток до нескольких недель, предпочтительно с интервалами 1 неделя, от 1 до 10 раз и предпочтительно 2 или 3 раза. От трех до семи суток после последнего дня иммунизации измеряют титр антител путем ферментного иммуноанализа (ELISA или EIA), радиоиммунного анализа (RIA) или других способов. Когда достигают желаемого титра антитела, кровь можно собирать с получением антисыворотки. В описанном выше способе сбора антитела, если это необходимо для очистки антитела, антитело можно очищать путем выбора подходящего способа из известных способов, таких как осаждение с сульфатом аммония, ионообменная хроматография, гелефильтрация и аффинная хроматография, путем комбинирования упомянутых выше способов соответствующим образом. После этого измеряют реактивность поликлонального антитела в антисыворотке способом ELISA или сходными с ним.

(3) Получение моноклонального антитела.

(3-1) Сбор антителопродуцирующих клеток.

Антитело против hTROP-2 по настоящему изобретению не ограничено, однако предпочтительно оно представляет собой моноклональное антитело.

Полученный антиген вводят млекопитающему, такому как крыса, мышь или кролик, для иммунизации. Дозировку антигена на животное можно определять соответствующим образом в зависимости от присутствия или отсутствия адъюванта. Здесь можно использовать те же адъюванты, которые описаны выше. Также здесь можно применять те же способы иммунизации, которые описаны выше. Через от одних до шестидесяти суток и предпочтительно через от одних до четырнадцати суток после последнего дня иммунизации антителопродуцирующие клетки собирают. Примеры таких антителопродуцирующих клеток включают клетки селезенки, клетки лимфатических узлов и клетки периферической крови. Среди них предпочтительными являются клетки лимфатических узлов и клетки селезенки.

(3-2) Слияние клеток.

Для получения гибридом (антителопродуцирующая клеточная линия) проводят слияние антителопродуцирующих клеток с клетками миеломы. В качестве клеток миеломы, подлежащих слиянию с антителопродуцирующими клетками, можно использовать широкодоступные общепринятые клетки из животных, таких как мыши. Клеточная линия, используемая в рамках изобретения, предпочтительно представляет собой клеточную линию, которая имеет селективность в отношении лекарственных средств, не может выжить в неслитом состоянии в селективной среде НАТ (содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин) и может выжить только в состоянии, слитом с антителопродуцирующими клетками.

Примеры клеток миеломы включают клеточные линии миеломы, такие как P3-X63-Ag8.653, P3-X63-Ag8(X63), P3-X63-Ag8.U1(P3U1), P3/NS 1/1-Ag4-1(NS1) и Sp2/0-Ag14(Sp2/0). Клетки миеломы можно выбирать соответствующим образом, учитывая совместимость с антителопродуцирующими клетками.

После этого клетки миеломы подвергают слиянию с антителопродуцирующими клетками. Для такого слияния клеток антителопродуцирующие клетки (от 1×10^6 до 1×10^7 клеток/мл) смешивают с клетками миеломы (от 2×10^5 до 2×10^6 клеток/мл) в среде для клеток животных, такой как среда DMEM или RPMI-1640, не содержащая сыворотки. Соотношение клеток между антителопродуцирующими клетками и клетками миеломы (антителопродуцирующие клетки: клетки миеломы) не ограничено. Как правило,

соотношение предпочтительно составляет от 1:1 до 10:1 и более предпочтительно 3:1. После этого проводят реакцию слияния в присутствии средства, обеспечивающего слияние клеток. В качестве такого средства, обеспечивающего слияние клеток, можно использовать полиэтиленгликоль, имеющий среднюю молекулярную массу 1000-6000 Да (D), или сходные с ним. Кроме того, также возможно проводить слияние антителопродуцирующих клеток с клетками миеломы с использованием коммерчески доступного устройства для слияния клеток, в котором используется электрическая стимуляция (например, электропорация).

(3-3) Выбор и клонирование гибридом.

Представляющие интерес гибридомы отбирают из клеток после обработки для слияния клеток. В качестве способа селекции гибридом суспензию клеток соответствующим образом разбавляют, например, средой RPMI-1640, содержащей эмбриональную телячью сыворотку, а затем разбавленный раствор распределяют в микропланшет для титрования. После этого в каждую лунку добавляют селективную среду. Культивирование проводят, заменяя соответствующим образом селективную среду свежей средой. В результате приблизительно через 14 суток после начала культивирования на селективной среде можно получать клетки, растущие в селективной среде, в качестве гибридом.

После этого проводят скрининг для исследования того, присутствует ли в супернатанте растущих гибридом антитело, реагирующее с hTROP-2. Скрининг гибридом можно проводить общепринятым способом, и, таким образом, способ скрининга конкретно не ограничен. Например, из культурального супернатанта растущих гибридом, содержащегося в лунке, отбирают аликвоту, а затем проводят скрининг с помощью ELISA, EIA, RIA или сходных с ними.

Клонирование слитых клеток можно проводить способом лимитирующих разведений или сходными с ним. Затем определяют антитело, демонстрирующее высокую реактивность в отношении hTROP-2 способом проточной цитометрии или сходными с ним, и отбирают гибридому, продуцирующую это антитело. Отобранную гибридому принимают в качестве клона.

(3-4) Сбор моноклонального антитела.

В качестве способа культивирования полученной гибридомы, а затем сбора моноклонального антитела из полученной культуры можно выбирать обычный способ культивирования, способ образования асцитов или сходные с ними. Термин "культура" используют в настоящем документе для обозначения обеспечения роста гибридом в культуральной чашке или в культуральной бутылки или обеспечения роста гибридом в брюшной полости животного, как описано ниже.

В случае способа культивирования клеток гибридомы культивируют в среде для клеток животных, такой как среда RPMI-1640, содержащая 10% эмбриональную телячью сыворотку, среда MEM или бесывороточная среда, в общепринятых условиях культивирования (например, 37°C, концентрация CO₂ 5%) в течение 7-14 суток, а затем из культурального супернатанта можно получать антитело.

В случае способа образования асцита приблизительно 1×10^7 гибридом вводят в брюшную полость животного того же вида, что и млекопитающее, из которого происходят клетки миеломы, так чтобы обеспечить пролиферацию больших количеств гибридом. Через 2-3 недели после этого предпочтительно собирают асцитическую жидкость.

В описанном выше способе сбора антител, если необходимо очистить антитело, антитело можно очищать путем выбора надлежащим образом подходящего способа из известных способов, таких как осаждение с сульфатом аммония, ионообменная хроматография, гель-фильтрация и аффинная хроматография, или путем комбинирования указанных выше способов.

(3-5) Отбор клона, обладающего противоопухолевой активностью.

Антитело против hTROP-2 по настоящему изобретению представляет собой антитело, обладающее противоопухолевой активностью *in vivo*.

Термин "противоопухолевая активность" используют в настоящем описании для обозначения активности уничтожения опухолевых клеток (злокачественных клеток) или активности ингибирования роста опухоли. Предпочтительные примеры такой противоопухолевой активности включают активность ингибирования роста злокачественных клеток и активность ингибирования ангиогенеза опухоли. Тип опухоли (опухолевых клеток) человека, в отношении которого антитело по настоящему изобретению способно проявлять противоопухолевую активность, включает различные типы различных опухолей человека, при которых подтверждена экспрессия hTROP-2. Тип такой опухоли человека конкретно не ограничен. Например, предпочтительными являются одно, или два, или более из рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека и более предпочтительным является рак поджелудочной железы человека.

Более того, описанная выше опухоль может представлять собой рецидивирующую злокачественную опухоль или метастазирующую злокачественную опухоль. Антитело по настоящему изобретению также способно проявлять превосходную противоопухолевую активность в отношении этих типов опухолей.

Наличие противоопухолевой активности *in vivo* может быть подтверждено, например, с использованием имеющей опухоль мыши (модель с ксенотрансплантатом на мышах), под кожу которой трансплантированы желаемые опухолевые клетки, а затем путем введения антитела, полученного, как описано

выше, мышцы. В этом случае антитело можно вводить сразу после трансплантации опухолевых клеток (модели предупреждения). Альтернативно, его можно вводить после подтверждения того, что трансплантированная опухоль достигла заданного объема (модели лечения). Способ введения не ограничен. Например, антитело можно вводить один раз в трое суток, раз в неделю, раз в десять суток или каждые две недели, или оно может представлять собой однократное введение (только один раз) в дозировке 5-20 мг/кг массы тела путем внутривенного введения или сходных с ними. В случае моделей предупреждения присутствие или отсутствие противоопухолевой активности и ее уровень можно оценивать на основе частоты образования опухоли и объема опухоли. В случае моделей лечения присутствие или отсутствие противоопухолевой активности и ее уровень можно оценивать на основе объема опухоли.

В настоящем изобретении предпочтительным примером антитела против hTROP-2, имеющего противоопухолевую активность *in vivo*, является антитело, для которого аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи представлены в SEQ ID NO: 36-38 соответственно и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи представлены в SEQ ID NO: 41-43 соответственно. Предпочтительным примером V-области Н-цепи является V-область Н-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 35. Предпочтительным примером V-области L-цепи является V-область L-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 40.

В качестве другого варианта осуществления антитела против hTROP-2 по настоящему изобретению примером V-области Н-цепи является V-область Н-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, представленной на SEQ ID NO: 45. Предпочтительным примером V-области L-цепи является V-область L-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 50.

Аналогично, в качестве следующего варианта осуществления антитела против hTROP-2 по настоящему изобретению предпочтительным примером является антитело, для которого аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи представлены в SEQ ID NO: 56-58 соответственно и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи представлены в SEQ ID NO: 61-63 соответственно. Предпочтительным примером V-области Н-цепи является V-область Н-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 55. Предпочтительным примером V-области L-цепи является V-область L-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 60.

Аналогично, в качестве следующего варианта осуществления антитела против hTROP-2 по настоящему изобретению предпочтительным примером является антитело, в котором аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи представлены в SEQ ID NO: 66-68 соответственно и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи представлены в SEQ ID NO: 71-73 соответственно. Предпочтительным примером V-области Н-цепи является V-область Н-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 65. Предпочтительным примером V-области L-цепи является V-область L-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 70.

В настоящем изобретении, более конкретно предпочтительные примеры антитела против hTROP-2, обладающего противоопухолевой активностью *in vivo*, включают моноклональное антитело против hTROP-2 (название клона: K5-70), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11251; моноклональное антитело против hTROP-2 (название клона: K5-107), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11252; моноклональное антитело против hTROP-2 (название клона: K5-116-2-1), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11253; моноклональное антитело против hTROP-2 (название клона: T6-16), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11346; и моноклональное антитело против hTROP-2 (название клона: T5-86), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11254.

В настоящем описании гибридома с номером доступа FERM BP-11251 называется "гибридомой мыши-мыши K5-70", и она была депонирована 12 мая 2010 г.; гибридома с номером доступа FERM BP-11252 называется "гибридомой мыши-мыши K5-107", и она была депонирована 12 мая 2010 г.; гибридома с номером доступа FERM BP-11253 называется "гибридомой мыши-мыши K5-116-2-1", и она была депонирована 12 мая 2010 г.; гибридома с номером доступа FERM BP-11346 называется "гибридомой мыши-мыши T6-16", и она была депонирована 1 марта 2011 г.; и гибридома с номером доступа FERM BP-11254 называется "гибридомой мыши-мыши T5-86", и она была депонирована 12 мая 2010 г. Все из этих гибридом были депонированы в International Patent Organism Depository (IPOD), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Independent Administrative Institution under the Ministry of Economy, Trade and Industry (the AIST, Tsukuba Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Япония, почтовый индекс: 305-8566).

Более того, другим предпочтительным примером антитела против hTROP-2 по настоящему изобретению является антитело против hTROP-2, которое связывается с участком (например, эпитопом), с которым связывается (распознает) моноклональное антитело, продуцируемое гибридомой, имеющей номер доступа № FERM BP-11251, FERM BP-11252, FERM BP-11253, FERM BP-11346 или FERM BP-11254.

Предпочтительные примеры такого эпитопа приведены в (3-6) ниже.

(3-6) Эпитоп антитела против hTROP-2.

Тип эпитопа (антигенной детерминанты) антитела против hTROP-2 по настоящему изобретению не ограничен, при условии, что он имеет по меньшей мере часть hTROP-2 в качестве антигена. Например, такой эпитоп предпочтительно представляет собой по меньшей мере часть области, образованной удалением области, состоящей из аминокислот в положениях 252-260, из аминокислотной последовательности hTROP-2, представленной в SEQ ID NO: 2, более предпочтительно по меньшей мере часть области, состоящей из аминокислот в положениях 1-69, или по меньшей мере часть области, состоящей из аминокислот в положениях 100-274 (за исключением области, состоящей из аминокислот в положении 252-260), и еще более предпочтительно по меньшей мере часть области, состоящей из аминокислот в положениях 27-69, или области, состоящей из аминокислот в положениях 109-206. Особенно предпочтительные примеры описанного выше эпитопа включают область, состоящую из аминокислот в положениях 43-65, область, состоящую из аминокислот в положениях 152-165, область, состоящую из аминокислот в положениях 171-183, область, состоящую из аминокислот в положениях 109-120, область, состоящую из аминокислот в положениях 193-206, область, состоящую из аминокислот в положениях 43-56, и участок, содержащий такую область, в аминокислотной последовательности hTROP-2, представленной в SEQ ID NO: 2. Более особенно предпочтительные примеры включают область, состоящую из аминокислот в положениях 43-65, область, состоящую из аминокислот в положениях 152-165, область, состоящую из аминокислот в положениях 171-183, область, состоящую из аминокислот в положениях 109-120, и участок, содержащий такую область. Антитело против hTROP-2, которое распознает описанные выше области (связывается с описанными выше областями или участками, содержащими такие области), имеет, например, высокую активность интернализации в опухолевые клетки, и, таким образом, в высокой степени подходит в качестве иммуноконъюгата, как описано ниже.

(3-7) Характеристики антитела против hTROP-2.

Как описано выше, антитело против hTROP-2 по настоящему изобретению представляет собой антитело, обладающее высокой противоопухолевой активностью *in vivo* в низкой дозе. В частности, предпочтительно, чтобы антитело против hTROP-2 по настоящему изобретению проявляло активность ингибирования роста опухоли, составляющую 50% или более (предпочтительно 80% или более, более предпочтительно 90% или более, еще более предпочтительно 95% или более и особенно предпочтительно практически 100% (например, 98% или более или 99% или более)) в дозе (в качестве "голового" антитела) 20 мг/кг массы тела или менее (предпочтительно 10 мг/кг массы тела или менее, более предпочтительно 5 мг/кг массы тела или менее и еще более предпочтительно 1 мг/кг массы тела или менее) в модели на животных, имеющих опухоль.

В этом случае активность ингибирования роста опухоли (%) можно вычислять, например, по следующей формуле:

Активность ингибирования роста опухоли (%) = $100 - \left[\frac{\text{объем опухоли или масса опухоли в группе введения антитела}}{\text{объем опухоли или масса опухоли в контрольной группе}} \right] \times 100$.

Кроме того, антитело против hTROP-2 по настоящему изобретению предпочтительно имеет противоопухолевую активность в отношении двух или более типов опухолевых клеточных линий человека. Тип такой опухолевой клеточной линии человека не ограничен. Например, такие опухолевые клеточные линии человека представляют собой клеточные линии по меньшей мере двух типов, выбранных из группы, состоящей из различных типов клеточных линий рака поджелудочной железы человека, клеточных линий рака предстательной железы человека, клеточных линий рака толстого кишечника человека и клеточных линий рака молочной железы. В частности, предпочтительные примеры таких опухолевых клеточных линий человека включают клеточные линии по меньшей мере двух типов, выбранных из группы, состоящей из клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-59, клеточной линии рака поджелудочной железы человека VxPC-3, клеточной линии рака поджелудочной железы человека KP-3L, клеточной линии рака поджелудочной железы человека KP-2, клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-1, клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-45H, клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-45P, клеточной линии рака поджелудочной железы человека TCC-PAN2, клеточной линии рака поджелудочной железы человека SUIT-2, клеточной линии рака толстого кишечника человека CACO-2, клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480, клеточной линии рака толстого кишечника человека DLD-1, клеточной линии рака толстого кишечника человека HCT 116, клеточной линии рака молочной железы человека JIMT-1, клеточной линии рака молочной железы человека HCC1143, клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7, клеточной линии рака предстательной железы человека DU145 и клеточной линии рака предстательной железы человека PC-3. Среди них в качестве описанных выше двух или более типов опухолевых клеточных линий человека более предпочтительными являются клеточная линия рака поджелудочной железы человека PK-59 и клеточная линия рака поджелудочной железы человека VxPC-3.

Более того, антитело против hTROP-2 по настоящему изобретению имеет константу диссоциации (величину Kd) предпочтительно $1,0 \times 10^{-10}$ М или менее, более предпочтительно $1,0 \times 10^{-11}$ М или менее и еще более предпочтительно $1,0 \times 10^{-12}$ М или менее. В рамках настоящего описания способность к связыванию (аффинность) антитела можно измерять в форме константы диссоциации (величины Kd), констан-

ты скорости диссоциации (K_{diss} [1/с]) или константы скорости ассоциации (K_{ass} [1/М.с]), например, с помощью анализа Скэтчарда или сенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса, называемого *Biacore*. В качестве такого устройства *Biacore* можно использовать, например, *Biacore 3000*, *Biacore 2000*, *Biacore X*, *Biacore J* и *Biacore Q* (все из которых изготавливаются *Biacore*). Предпочтительно, чтобы антитело имело константу диссоциации (величину K_d), которая является настолько малой, насколько это возможно, чтобы оно могло иметь высокую способность к связыванию (аффинность). Величину K_d определяют на основе двух параметров K_{diss} и K_{ass} , и она может быть выражена формулой: $K_d[M] = K_{diss}/K_{ass}$. В качестве способа вычисления величины K_d предпочтительно можно использовать способ, описанный в примерах ниже (в частности, пример 10).

(4) Генетически рекомбинантное антитело и фрагмент антитела.

(4-1) Генетически рекомбинантное антитело.

В предпочтительном варианте осуществления антитела против hTROP-2 по настоящему изобретению предусмотрено генетически рекомбинантное антитело. Тип такого генетически рекомбинантного антитела не ограничен. Примеры включают химерное антитело, гуманизированное антитело и антитело человека.

Химерное антитело (т.е. гуманизированное химерное антитело) представляет собой антитело, образованное лигированием (конъюгацией) вариабельной области происходящего из мыши антитела в константную область происходящего из человека антитела (см. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6851-6855, (1984) и т.д.). Когда получают такое химерное антитело, можно легко конструировать лигированное таким образом антитело способом генетической рекомбинации.

Когда получают гуманизированное антитело, определяющую комплементарность область (CDR) трансплантируют из вариабельной области антитела мыши в вариабельную область антитела человека, так чтобы получить реконструированную вариабельную область, в которой каркасная область (FR) происходит из человека и CDR происходит из мыши (это называют пересадкой CDR (трансплантацией CDR)). Затем реконструированную таким образом гуманизированную вариабельную область человека лигируют в константную область человека. Такой способ получения гуманизированного антитела хорошо известен в данной области техники (см. *Nature*, 321, 522-525 (1986); *J. Mol. Biol.*, 196, 901-917 (1987); Queen C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 10029-10033 (1989); публикацию патента Японии (Kohyo) № 4-502408 A (1992) (патент Японии № 2828340; Queen et al.) и т.д.).

Как правило, в случае антитела человека (полное антитело человека) его структура, содержащая гипервариабельную область, которая представляет собой антигенсвязывающий центр V-области, другие части V-области и константную область, является такой же, как и структура антитела человека. Однако такая гипервариабельная область также может происходить из других животных. Способ получения антитела человека является общеизвестным, и был разработан способ получения последовательностей генов, которые являются общими у человека, путем генетической инженерии. Антитело человека можно получать, например, способом с использованием продуцирующей антитело мыши, которая имеет хромосомные фрагменты человека, содержащие гены H-цепи и L-цепи антитела человека (см. Tomizuka, K. et al., *Nature Genetics*, (1977) 16, 133-143; Kuroiwa, Y. et al., *Nuc. Acids Res.*, (1998) 26, 3447-3448; Yoshida, H. et al., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects*, (1999) 10, 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. и Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers; Tomizuka, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2000) 97, 722-727 и т.д.), или способом получения происходящего из фагового дисплея антитела человека, выбранного из библиотеки антител человека (см. Wormstone, I.M. et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, (2002) 43 (7), 2301-8; Carmen, S. et al., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, (2002) 1 (2), 189-203; Siriwardena, D. et al., *Ophthalmology*, (2002) 109 (3), 427-431 и т.д.).

В случае упомянутого выше химерного антитела, гуманизированного антитела и антитела человека связанная N-гликозидной связью цепь сахара в Fc-области антитела предпочтительно представляет собой цепь сахара, в которой фукоза не связана с N-ацетилглюкозамином на его восстанавливающем конце. Конкретным примером является антитело, состоящее из генетически рекомбинантной молекулы антитела, которое имеет в Fc-области молекулы антитела цепь сахара, в которой положение 1 фукозы не связано с положением 6 N-ацетилглюкозамина на восстанавливающем конце связанной N-гликозидной связью цепи сахара через α связь. Такое антитело способно значительно увеличить активность ADCC. Этот фактор (характеристики связанной N-гликозидной связью цепи сахара в Fc-области антитела) является предпочтительным также для упомянутого выше поликлонального антитела и моноклонального антитела.

(4-2) Фрагмент антитела.

Антитело по настоящему изобретению включает фрагмент антитела против hTROP-2 (неполный фрагмент) по настоящему изобретению. В рамках изобретения фрагмент антитела по настоящему изобретению обладает активностью связывания с hTROP-2 (а именно способен связываться с hTROP-2) и также обладает противоопухолевой активностью *in vivo*, как в случае антитела против hTROP-2 по настоящему изобретению.

Фрагмент антитела означает область участка поликлонального антитела против hTROP-2 или моноклонального антитела против hTROP-2 (а именно фрагмент антитела, происходящий из антитела против

hTROP-2 по настоящему изобретению). Примеры такого фрагмента антитела включают пептиды, содержащие в качестве по меньшей мере его части Fab, Fab', F(ab')₂, Fv (вариабельный фрагмент антитела), одноцепочечное антитело (Н-цепь, L-цепь, V-область Н-цепи и V-область L-цепи и т.д.), scFv, диатело (димер scFv), dsFv (стабилизированная дисульфидной связью V-область) и определяющую комплементарность область (CDR).

Fab представляет собой фрагмент антитела с молекулярной массой приблизительно 50000, обладающий активностью связывания антигена, который образован связыванием приблизительно половины N-концевой стороны Н-цепи с целой L-цепью через дисульфидную связь, из числа фрагментов, получаемых обработкой молекул антитела протеазой папаином. Кроме того, также можно получать такой Fab путем встраивания ДНК, кодирующей Fab антитела, в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии, а затем вводить вектор в прокариоты или эукариоты, так чтобы обеспечить экспрессию ДНК в нем.

F(ab')₂ представляет собой фрагмент антитела с молекулярной массой приблизительно 100000, обладающий активностью связывания антигена, размер которого немного превышает Fab, который связан с Fab через дисульфидную связь в шарнирной области, из числа фрагментов, получаемых обработкой молекул антитела протеазой пепсином. Кроме того, также можно получить такой F(ab')₂ путем связывания Fab тиоэфирной связью или дисульфидной связью, как описано ниже.

Fab' представляет собой фрагмент антитела с молекулярной массой приблизительно 50000, обладающей активностью связывания антигена, который образован расщеплением дисульфидной связи в шарнирной области упомянутого выше F(ab')₂. Кроме того, также можно получать такой Fab' путем встраивания ДНК, кодирующей Fab'-фрагмент антитела, в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии, а затем встраивания вектора в прокариоты или эукариоты, чтобы обеспечить экспрессию ДНК в нем.

scFv представляет собой фрагмент антитела, обладающий активностью связывания антигена, который представляет собой полипептид VH-P-VL или VL-P-VH, образованный лигированием одной V-области Н-цепи (VH) с одной V-областью L-цепи (VL) с использованием пригодного пептидного линкера (P). Такой scFv можно получать путем получения кДНК, кодирующей VH и VL антитела, конструирования ДНК, кодирующей scFv, встраивания ДНК в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии, а затем введения вектора в прокариоты или эукариоты, так чтобы обеспечить экспрессию ДНК в нем.

Диатело представляет собой фрагмент антитела, образованный димеризацией scFv, который обладает двухвалентной активностью связывания антигена. Такая двухвалентная активность связывания антигена может быть идентичной или она может различаться. Такое диатело можно получать путем получения кДНК, кодирующей VH и VL антитела, конструирования ДНК, кодирующей scFv, так чтобы длина аминокислотной последовательности P составляла 8 остатков или менее, встраивания ДНК в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии, а затем введения вектора в прокариоты или эукариоты, так чтобы обеспечить экспрессию ДНК в нем.

dsFv представляет собой фрагмент антитела, образованный связыванием полипептидов, в которых один аминокислотный остаток каждой из VH и VL заменен остатком цистеина, друг с другом через дисульфидную связь между остатками цистеина. Аминокислотный остаток, подлежащий замене на остаток цистеина, можно выбирать на основе оценки трехмерной структуры антитела согласно способу Reiter et al. (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994). Такой dsFv можно получать путем получения кДНК, кодирующей VH и VL антитела, конструирования ДНК, кодирующей dsFv, встраивания ДНК в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии, а затем введения вектора в прокариоты или эукариоты, чтобы обеспечить экспрессию ДНК в нем.

Пептид, содержащий CDR, содержит по меньшей мере одну область CDR из VH (CDR 1-3) и CDR из VL (CDR 1-3). Более предпочтительные примеры такого пептида включают пептид, содержащий все из CDR VH, и пептид, содержащий все из CDR VL. Особенно предпочтительным примером пептида является пептид, содержащий все из CDR VH и VL (всего 6 областей). Предпочтительные примеры аминокислотной последовательности такого CDR включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 36-38, 41-43, 46-48, 51-53, 56-58, 61-63, 66-68 и 71-73, как описано выше. В пептиде, содержащем множество CDR, они могут быть связаны друг с другом прямо или через пригодный пептидный линкер. Такой пептид, содержащий CDR, можно получать путем конструирования ДНК, кодирующей VH и VL антитела, встраивания ДНК в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии, а затем введения вектора экспрессии в прокариоты или эукариоты, так чтобы обеспечить экспрессию ДНК в нем. Более того, такой пептид, содержащий CDR, также можно получать способами химического синтеза, такими как способ с Fmoc (способ с флуоренилметилоксикарбонилем) и способ с tBoc (способ с трет-бутилоксикарбонилем).

Фрагмент антитела по настоящему изобретению, как есть, может представлять собой фрагмент антитела, который содержит часть или всю Fc-область антитела, в которой фукоза не связана с N-ацетилглюкозаминном на восстанавливающем конце связанной N-гликозидной связью цепи сахара. В ином случае фрагмент антитела по настоящему изобретению также может представлять собой слитый

белок, в котором упомянутый выше фрагмент антитела слит с частью или всей Fc-областью антитела, в которой фукоза не связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливаемом конце связанной N-гликозидной связью цепи сахара. Такой фрагмент антитела способен значительно увеличить активность ADCC и, таким образом, является предпочтительным.

Далее в настоящем описании упомянутые выше фрагменты антитела также включены в антитело против hTROP-2 по настоящему изобретению.

3. Получение конъюгата антитело-лекарственное средство.

В качестве иммуноконъюгата, полученного с использованием упомянутого выше антитела против hTROP-2 по настоящему изобретению, может быть предоставлен конъюгат антитело-лекарственное средство, который содержит упомянутое выше антитело и вещество (соединение и т.д.), обладающее противоопухолевой активностью и/или активностью уничтожения клеток. Следует отметить, что конъюгат, образованный путем предварительного получения каждого из упомянутой выше молекулы антитела и упомянутого выше вещества, обладающего противоопухолевой активностью и/или активностью уничтожения клеток, по отдельности, а затем комбинирования их, как правило, называют иммуноконъюгатом. С другой стороны, конъюгат, полученный лигированием гена белкового токсина, используемого в качестве такого вещества, обладающего противоопухолевой активностью и/или активностью уничтожения клеток, с геном антитела в соответствии со способом генетической рекомбинации, чтобы обеспечить его экспрессию в качестве отдельного белка (слитого белка), обычно называют иммунотоксином.

Примеры вещества, обладающего противоопухолевой активностью, включают доксорубин, калихеамицин, митомицин С, ауристин Е и радиоактивный изотоп (RI). Примеры вещества, обладающего активностью уничтожения клеток, включают сапорин, лизин, экзотоксин *pseudomonas*, дифтерийный токсин и радиоактивный изотоп (RI). Среди них, предпочтительно, используют сапорин и экзотоксин *pseudomonas*. Тип RI, обладающего противоопухолевой активностью и/или активностью уничтожения клеток, конкретно не ограничен, и примеры такого RI включают ^{90}Y , ^{111}In , ^{125}I , ^3H , ^{35}S , ^{14}C , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{198}Au , ^{224}Ac , ^{126}I , ^{133}I , ^{77}Br , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, $^{121\text{m}}\text{Te}$, $^{122\text{m}}\text{Te}$, $^{125\text{m}}\text{Te}$, ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{111}Ag , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{18}F , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{86}Y , ^{169}Yb , ^{166}Dy , ^{212}Pb и ^{223}Ra .

Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство не ограничен. Например, применяют способ связывания антитела с лекарственным средством через дисульфидную связь или гидразонную связь.

Упомянутое выше антитело против hTROP-2 по настоящему изобретению является превосходным с точки зрения активности интернализации в опухолевые клетки-мишени, которые экспрессируют hTROP-2. Таким образом, путем предварительного комбинирования вещества, обладающего противоопухолевой активностью и активностью уничтожения клеток, с антителом против hTROP-2 становится возможным обеспечение прямого и высокоселективного действия такого вещества на опухолевые клетки. Конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению является в высокой степени превосходным с точки зрения способности доставки средства в опухолевые клетки-мишени.

Активность интернализации в клетки можно оценивать путем флуоресцентного мечения антитела родамином или сходными с ним, а затем наблюдения за миграционным поведением и локализацией антитела с использованием флуоресцентного микроскопа или сходных с ним.

Более того, в настоящем изобретении в дополнение к упомянутому выше конъюгату антитело-лекарственное средство также может быть предусмотрен конъюгат фрагмент антитела-лекарственное средство, в котором вместо антитела используют упомянутый выше фрагмент антитела. Что касается деталей такого конъюгата фрагмент антитела-лекарственное средство, могут соответствующим образом применяться описания упомянутого выше конъюгата антитело-лекарственное средство.

Далее в настоящем описании такой конъюгат фрагмент антитела-лекарственное средство также включен в конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению.

4. Фармацевтическая композиция.

Антитело против hTROP-2 и конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению пригодны в качестве активных ингредиентов, содержащихся в фармацевтической композиции.

Фармацевтическая композиция пригодна в качестве фармацевтической композиции для лечения и/или диагностики опухоли. В частности, поскольку антитело против hTROP-2 по настоящему изобретению и конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий указанное выше антитело, обладают превосходной активностью ингибирования роста опухоли в качестве такой противоопухолевой активности, их предпочтительно используют для лечения опухоли. Иными словами, антитело против hTROP-2 и конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению пригодны в качестве активных ингредиентов, содержащихся в лекарственном средстве против опухоли и средстве для диагностики опухоли. Следует отметить, что описанное выше лечение опухоли включает ингибирование роста опухоли и подавление роста опухоли. В частности, в случае лекарственного средства против опухоли примеры лекарственного средства против опухоли включают ингибитор роста опухоли и супрессор роста опухоли.

Предпочтительно предоставлять фармацевтическую композицию по настоящему изобретению в форме фармацевтической композиции, содержащей антитело против hTROP-2 и/или конъюгат антитело-

лекарственное средство по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента(ов) и дополнительно содержащей фармакологически приемлемый носитель. Кроме того, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с известными противоопухолевыми средствами. Путем такого комбинированного применения можно достигать более высокого противоопухолевого эффекта.

Мишеневые заболевания (опухоли), против которых применяют фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, включают упомянутые выше различные типы известных опухолей человека, в которых ранее была подтверждена экспрессия hTROP-2. Среди прочих, особенно предпочтительными являются один или несколько типов, выбранных из рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека. Такое мишеневое заболевание может представлять собой одно заболевание, или два, или более заболеваний могут развиваться совместно. Более того, мишеневая опухоль может представлять собой рецидивирующую злокачественную опухоль или метастазирующую злокачественную опухоль. Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению (далее, антитело против hTROP-2 и/или конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению) можно эффективно использовать в качестве лекарственного средства и диагностического средства против рецидивирующей злокачественной опухоли или метастазирующей злокачественной опухоли.

Примеры "фармакологически приемлемого носителя" включают эксципиент, разбавитель, наполнитель, дезинтегрирующее вещество, стабилизатор, консервант, буфер, эмульгатор, ароматизатор, краситель, подсластитель, загуститель, модификатор лекарственных веществ, солюбилизатор и другие добавки. С использованием одного или нескольких типов таких носителей фармацевтическую композицию можно получать в форме инъекции, жидкого средства, капсулы, суспензии, эмульсии, сиропа и т.д. Эти фармацевтические композиции можно вводить перорально или парентерально. Другой формой для парентерального введения является, например, инъекция, содержащая один или несколько активных ингредиентов, которые получают обычным способом. Такую инъекцию можно получать путем растворения или суспендирования антитела по настоящему изобретению в фармакологически приемлемом носителе, таком как нормальный солевой раствор или коммерчески доступная дистиллированная вода, используемая для инъекции.

В частности, когда фрагмент антитела, происходящий из антитела против hTROP-2 по настоящему изобретению (в частности, фрагмент антитела с низкой молекулярной массой), вводят в живой организм, в дополнение к упомянутым выше компонентам можно использовать коллоидную дисперсионную систему. Ожидается, что такая коллоидная дисперсионная система обладает эффектом повышения стабильности соединения (фрагмента антитела) в живом организме или эффектом эффективного транспорта такого соединения в конкретный орган, ткань или клетку. Тип такой коллоидной дисперсионной системы не ограничен при условии, что она является широко используемой. Примеры такой коллоидной дисперсионной системы включают дисперсионные системы, содержащие в качестве основ полиэтиленгликоль, макромолекулярный конъюгат, макромолекулярный агрегат, нанокapsулы, микросферы, гранулы и липиды, включающие эмульгатор типа "масло-в-воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Предпочтительные примеры такой коллоидной дисперсионной системы включают множество липосом и везикул из искусственных мембран, которые обладают эффектом эффективного транспорта такого соединения в конкретный орган, ткань или клетку (Mannino et al., *Biotechniques*, 1988, 6, 682; Blume and Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1990, 1029, 91; Lappalainen et al., *Antiviral Res.*, 1994, 23, 119; Chonn and Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, 698).

Дозировки фармацевтической композиции по настоящему изобретению различаются в зависимости от возраста, пола, массы тела и симптомов пациента, терапевтических эффектов, способа введения, времени лечения, типов антитела против hTROP-2 и конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, содержащихся в фармацевтической композиции, и т.д. Как правило, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить в диапазоне от 600 мкг до 6000 мг на взрослого человека на введение. Однако доза не ограничивается упомянутым выше диапазоном.

В случае, когда фармацевтическую композицию вводят в форме инъекции, например, ее можно вводить в дозировке от 100 мкг до 100 мг на введение, на массу тела пациента-человека, один раз или в разделенной дозе на протяжении нескольких введений, в качестве средней суточной дозы. Предпочтительно фармацевтическую композицию можно вводить раз в трое суток, раз в неделю, раз в десять суток или раз в две недели или путем однократного введения (где общее количество введений равно 1). Примеры дозированной формы включают внутривенную инъекцию, подкожную инъекцию, внутрикожную инъекцию, внутримышечную инъекцию и внутривентральную инъекцию. Среди них предпочтительной является внутривенная инъекция. Кроме того, такую инъекцию можно приготавливать в форме неводного разбавителя (например полиэтиленгликоль, растительное масло, такое как оливковое масло, спирты, такие как этанол, и т.д.), суспензии или эмульсии. Такую инъекцию можно стерилизовать путем механической стерилизации с использованием фильтра, смешения с микробицидным средством и т.д. Инъекцию можно получать в форме инъекции, приготавливаемой перед применением. В этом случае стерилизованную твердую композицию получают способом лиофилизации или сходными с ним, а затем компо-

зицию растворяют в стерилизованной дистиллированной воде, используемой для инъекции, или в других растворителях перед ее применением, после чего ее можно использовать.

Настоящее изобретение относится к применению упомянутого выше антитела против hTROP-2 и/или конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению для получения фармацевтического средства (лекарственное средство) для лечения и/или диагностики опухоли. Кроме того, настоящее изобретение относится к упомянутому выше антителу против hTROP-2 и/или конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, которые используют для лечения и/или диагностики опухоли.

Более того, настоящее изобретение относится к способу лечения и/или диагностики опухоли, который характеризуется тем, что он включает применение (а именно введение пациентам) упомянутого выше антитела против hTROP-2 и/или конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению. Более того, настоящее изобретение также относится к применению упомянутого выше антитела против hTROP-2 и/или конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению для лечения и/или диагностики опухоли.

5. Способ детекции опухоли.

Способ детекции опухоли по настоящему изобретению характеризуется тем, что он включает обеспечение реакции упомянутого выше антитела против hTROP-2 по настоящему изобретению с образцом, взятым из живого организма (далее называемым биологическим образцом), и детекцию сигнала(ов) вступившего в реакцию антитела.

Как описано выше, было подтверждено, что hTROP-2 специфически экспрессируется в различных типах опухолевых клеток. Таким образом, hTROP-2, и, в частности, свободный hTROP-2 (часть hTROP-2, представляющая собой внеклеточную область) можно использовать в качестве маркера для различных типов опухолей. В частности, такой hTROP-2 предпочтительно можно использовать в качестве маркера для рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека.

Таким образом, антителу против hTROP-2 по настоящему изобретению позволяют реагировать с биологическим образцом, а затем проводят детекцию сигнала вступившего в реакцию антитела, так чтобы выявить опухоль. Полученный сигнал антитела можно использовать в качестве индикатора количества антигена в биологическом образце (т.е. количества hTROP-2 или количества свободного hTROP-2). При детекции опухоли с использованием антитела по настоящему изобретению сначала биологическому образцу, взятому в качестве анализируемого образца от индивидуума, такому как срез ткани или кровь, используемые в качестве исследуемой мишени, позволяют связываться с антителом по настоящему изобретению в реакции антиген-антитело. После этого на основе результатов измерения количества связавшегося антитела измеряют количество представляющего интерес антигена, содержащегося в биологическом образце. Это измерение можно проводить в соответствии с известными способами иммуноанализа. Например, можно использовать способ иммунопреципитации, способ иммуноагглютинации, радиоиммунный анализ, иммунонефелометрию, способ вестерн-блоттинга, проточную цитометрию и т.п. В радиоиммунном анализе используют меченое антитело, и, таким образом, сигнал антитела выражают в качестве количества меченого антитела, которое прямо выявляют. В ином случае антитело, концентрация или титр которого известны, можно использовать в качестве стандартного раствора, и, таким образом, сигнал заданного антитела можно выражать в качестве относительной величины. Следовательно, измерение как в стандартном растворе, так и в анализируемом образце можно проводить с использованием устройства для измерения, и сигнал антитела в биологическом образце можно выражать в качестве величины, относительной к величине стандартного раствора, используемой в качестве критерия. Примеры такого радиоиммунного анализа включают способ ELISA, способ EI, способ RIA, флуоресцентный иммуноанализ (FIA) и люминесцентный иммуноанализ. Среди них способ ELISA является особенно предпочтительным, поскольку он является простым и высокочувствительным.

В соответствии с настоящим изобретением состояние опухоли можно оценивать или диагностировать с использованием результата детекции, полученного с помощью упомянутого выше способа детекции, в качестве индикатора. Например, когда результат детекции превышает заданную стандартную величину, состояние опухоли определяют как положительное по опухоли, и когда результат детекции меньше заданной стандартной величины, его определяют как отрицательный по опухоли. В случае положительного по опухоли результата определяют, что мог развиваться определенный тип опухоли, и, таким образом, можно оценить состояние опухоли. Термин "состояние опухоли" используют в настоящем описании для обозначения присутствия или отсутствия развития опухоли или ее степени прогрессирования. Таким образом, конкретные примеры состояния опухоли включают присутствие или отсутствие развития опухоли, степень ее прогрессирования, степень злокачественности, присутствие или отсутствие метастазов и присутствие или отсутствие рецидива.

В упомянутой выше оценке в качестве состояния опухоли, подлежащего оценке, может быть выбрано только одно состояние из упомянутых выше примеров или могут быть объединены и выбраны несколько примеров. Присутствие или отсутствие опухоли можно оценивать путем определения того, развилась ли опухоль относительно заданной стандартной величины, используемой в качестве границы, на

основе полученного результата детекции. Степень злокачественности используют в качестве индикатора, который указывает на степень прогрессирования злокачественной опухоли. На основе результата детекции рассматриваемую опухоль можно классифицировать на определенную стадию заболевания и можно оценивать. В ином случае раннюю злокачественную опухоль и развернутую злокачественную опухоль можно отличить друг от друга, а затем их можно оценивать. Например, также можно определить рассматриваемую опухоль как раннюю злокачественную опухоль или развернутую злокачественную опухоль с использованием результата детекции в качестве индикатора. Метастаз опухоли можно оценивать путем определения того, появилось ли новообразование в области, отдаленной от положения первоначального очага повреждения, с использованием результата детекции в качестве индикатора. Рецидив можно оценивать путем определения того, превышает ли результат детекции заданную стандартную величину вновь после стадии промежуточного периода или ремиссии.

6. Набор для детекции или диагностики опухоли.

Антитело против hTROP-2 по настоящему изобретению может быть предоставлено в форме набора для детекции или диагностики опухоли. Набор по настоящему изобретению содержит вещество для мечення, твердофазный реагент, на котором иммобилизовано антитело или меченое антитело, и т.д., а также упомянутое выше антитело. Вещество для мечення, которым метят антитело, означает вещество, меченное ферментом, радиоизотопом, флуоресцентным соединением, хемилюминесцентным соединением и т.д. Набор по настоящему изобретению также может содержать другие реагенты, используемые для проведения детекции по настоящему изобретению, в дополнение к упомянутым выше составным элементам. Например, когда такое вещество для мечення представляет собой ферментное вещество для мечення, набор по настоящему изобретению может содержать субстрат фермента (хромогенный субстрат и т.д.), раствор для растворения субстрата фермента, раствор для остановки ферментативной реакции, разбавитель, используемый для анализируемых веществ, и т.д. Более того, набор по настоящему изобретению может дополнительно содержать различные типы буферов, стерилизованную воду, различные типы емкостей для культивирования клеток, различные типы реакторов (пробирка Eppendorf и т.д.), блокирующее средство (компонент сыворотки, такой как бычий сывороточный альбумин (BSA), обезжиренное молоко или сыворотка козы), средство для промывания, поверхностно-активное вещество, различные типы планшетов, антисептик, такой как азид натрия, руководство по эксплуатации (инструкцию) и т.д.

Набор по настоящему изобретению можно эффективно использовать для осуществления упомянутого выше способа детекции по настоящему изобретению, и, таким образом, он является чрезвычайно полезным.

Далее настоящее изобретение более конкретно описано в следующих примерах. Однако эти примеры не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Пример 1. Клонирование гена hTROP-2.

Полноразмерный ген hTROP-2 выделяли из печени эмбриона человека (10-недельный эмбрион) способом ОТ-ПЦР. Сначала конструировали следующие праймеры для ПЦР на основе последовательности гена hTROP-2 (номер доступа Genbank № NM_002353).

Прямой праймер: 5'-ttctccgccccaccatggc-3' (SEQ ID NO: 3).

Обратный праймер: 5'-ctcgagcaagctcggtcttctc-3' (SEQ ID NO: 4).

Когда конструировали праймеры, к обратному праймеру добавляли последовательность, расщепляемую ферментом рестрикции XhoI, за исключением стоп-кодона. кДНК синтезировали из общей РНК (TAKARA), полученной из печени эмбриона человека (10-недельный эмбрион). С использованием этой кДНК в качестве матрицы проводили реакцию ПЦР с упомянутыми выше праймерами. После этого проводили разделение с помощью агарозного гель-электрофореза и извлечение полосы представляющего интерес фрагмента, а затем его клонировали в вектор pCRII (Invitrogen) (pCRII-hTROP-2). Клонированную кДНК hTROP-2 подтверждали секвенированием.

Вектор экспрессии конструировали путем вырезания фрагмента EcoRI/XhoI содержащего ген hTROP-2, из pCRII-hTROP-2, а затем встраивания этого фрагмента в участок EcoRI/XhoI вектора pcDNA4/myc-His® A (Invitrogen) (pcDNA4-hTROP-2-myc/His). Более того, фрагмент HindIII/PmeI, содержащий ген hTROP-2, вырезали из pcDNA4-hTROP-2-myc/His (где участок расщепления HindIII имел тупой конец), а затем фрагмент встраивали в участок PmeI вектора pcDNA3.1(+) (Invitrogen), так чтобы сконструировать вектор экспрессии, содержащий ген устойчивости к неомицину (pcDNA3.1-hTROP-2-myc/His).

Пример 2. Конструирование клеточной линии, способной стабильно экспрессировать ген hTROP-2.

Вектор экспрессии (pcDNA3.1-hTROP-2-myc/His), кодирующий полноразмерную кДНК hTROP-2, полученный описанным выше способом, вводили в клетки HEK293 (RIKEN), клетки HuH-7 (HSRRB), клетки 7E2-C (описанные в WO 2005/052156) и клетки CHO-K1 (HSRRB) с использованием реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen) и проводили селекцию с использованием антибиотика G418 (генетицин; GIBCO BRL). После этого устанавливали и получали клеточную линию, которая стабильно экспрессировала hTROP-2.

Пример 3. Получение рекомбинантного белка внеклеточной области hTROP-2.

Фрагмент гена, кодирующий часть внеклеточной области hTROP-2 (в частности область, состоя-

щую из аминокислот в положениях 1-263 из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2), амплифицировали способом ПЦР. Для амплификации использовали следующие праймеры.

Прямой праймер: 5'-ttctccgccccaccatggc-3' (SEQ ID NO: 3).

Обратный праймер: 5'-ctcagactcgtccaggaatagatgagcg-3' (SEQ ID NO: 5).

В этом процессе к обратному праймеру добавляли последовательность, расщепляемую ферментом рестрикции XhoI. Фрагмент ДНК, амплифицированный способом ПЦР, разделяли агарозным гель-электрофорезом, а затем его очищали с использованием набора для экстракции из геля Gel Extraction Kit QIAquick (зарегистрированный торговый знак) (QIAGEN). Очищенный фрагмент ДНК субклонировали в вектор PCR Blunt vector (Invitrogen) (pCRB-hTROP-2 EC), и последовательность гена подтверждали. Затем фрагмент EcoRI/XhoI, содержащий фрагмент гена, кодирующий внеклеточную область hTROP-2, вырезали из pCRB-hTROP-2 EC, а затем его встраивали в участок EcoRI/XhoI вектора pcDNA4/myc-His® A (Invitrogen) (pcDNA4mH-hTROP-2 EC). Далее, для получения участка расщепления ферментом рестрикции NruI, следующие олигонуклеотиды соединяли и встраивали в участок BamHI/EcoRI pcDNA4mH-hTROP-2 EC.

Олигонуклеотид 1: 5'-gatccactagtcgagtggtgg-3' (SEQ ID NO: 6).

Олигонуклеотид 2: 5'-aattccaccactcgactagtg-3' (SEQ ID NO: 7).

Аналогично линкер pBgl II (TAKARA) встраивали в участок PmeI pcDNA4mH-hTROP-2 EC (pcDNA4mH-NB-hTROP-2 EC). Для получения рекомбинантного белка с использованием бакуловируса фрагмент NruI/BglII, содержащий фрагмент гена, кодирующий внеклеточную область hTROP-2, вырезали из pcDNA4mH-NB-hTROP-2 EC, а затем встраивали в участок NruI/BglII вектора pPSC8 (Nosan Corporation) (pPSC8-hTROP-2 EC). Производство рекомбинантного белка внеклеточной области hTROP-2 с использованием бакуловируса было поручено Nosan Corporation.

Рекомбинантный белок внеклеточной области hTROP-2 очищали следующим образом. Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Biosciences) добавляли в культуральный супернатант, содержащий рекомбинантный белок, так что им позволяли связываться друг с другом при 4°C в течение 2 ч. После этого полученный материал промывали фосфатным буфером, содержащим 20 мМ имидазол, с использованием EconoColumn (BIO RAD), а затем его элюировали с помощью фосфатного буфера, содержавшего 300 мМ имидазол, с тем чтобы его очистить.

Пример 4. Выделение кДНК ЕрСAМ человека и конструирование вектора экспрессии.

Полноразмерный ген ЕрСAМ человека выделяли из эмбриональной печени человека (10-недельный эмбрион) способом ОТ-ПЦР. Сначала конструировали следующие праймеры для ПЦР, исходя из последовательности гена ЕрСAМ человека (номер доступа Genbank № NM_0 023 54).

Прямой праймер: 5'-tcctcgtgtccactcccg-3' (SEQ ID NO: 8).

Обратный праймер: 5'-ctcagatgcattgagttccctatgc-3' (SEQ ID NO: 9).

Когда конструировали праймеры, к обратному праймеру добавляли последовательность, расщепляемую ферментом рестрикции XhoI, за исключением стоп-кодона. кДНК синтезировали из общей РНК (TAKARA), полученной из печени эмбриона человека (10-недельный эмбрион). С использованием этой кДНК в качестве матрицы проводили реакцию ПЦР с упомянутыми выше праймерами. После этого проводили разделение с помощью агарозного гель-электрофореза и извлечение полосы представляющего интерес фрагмента, а затем его клонировали в вектор pCRII (Invitrogen) (pCRII-hErCAM). Клонированную кДНК ЕрСAМ человека подтверждали секвенированием.

Вектор экспрессии конструировали путем вырезания фрагмента EcoRI/XhoI, содержащего ген ЕрСAМ из pCRII-hErCAM, а затем встраивания этого фрагмента в участок EcoRI/XhoI вектора pcDNA4/myc-His® A (Invitrogen) (pcDNA4-hErCAM-myc/His). Более того, фрагмент HindIII/PmeI, содержащий ген ЕрСAМ человека, вырезали из pcDNA4-hErCAM-myc/His (где участок расщепления HindIII имел тупой конец), а затем фрагмент встраивали в участок PmeI вектора pcDNA3.1(+) (Invitrogen), так чтобы сконструировать вектор экспрессии, содержащий ген устойчивости к неомицину (pcDNA3.1-hErCAM-myc/His).

Пример 5. Получение моноклонального антитела против hTROP-2.

В качестве иммуногенов использовали клеточные линии, способные стабильно экспрессировать hTROP-2 (клетки HEK293-hTROP-2, клетки CHO-K1-hTROP-2 и клетки 7E2-C-hTROP-2); клеточную линию рака поджелудочной железы человека, эндогенно экспрессирующую белок hTROP-2 на клеточной поверхности (PK-59, RCB1901; приобретенную в банке клеток RIKEN); и рекомбинантный белок внеклеточной области hTROP-2, полученный описанным выше способом.

В случае клеточных линий, способных стабильно экспрессировать hTROP-2, использовали 1×10^7 клеток, и в случае рекомбинантного белка hTROP-2 использовали 20 мкг белка. Клеточные линии или рекомбинантный белок смешивали с адъювантом TiterMax Gold (Funakoshi Corporation) в соотношении при смешивании 1:1, с тем чтобы получить эмульсию. Затем эмульсию инъецировали в две подушечки лап или брюшную полость мыши (C57/BL6, Balb/c) (первоначальная иммунизация). Когда иммунизацию проводили путем инъекции в две подушечки лап в течение короткого периода времени, через от трех до десяти суток после первоначальной иммунизации проводили вспомогательную инъекцию. На следую-

щие сутки после конечной иммунизации собирали лимфатические узлы обоих колен, а затем получали лимфоциты. Когда иммунизацию проводили путем инъекции в брюшную полость в течение длительного периода времени, вспомогательные инъекции проводили с интервалами один раз в неделю после первоначальной иммунизации (где вспомогательные инъекции проводили в течение от 1 до 2 месяцев). После этого из селезенки выделяли В-клетки стандартным способом. В случае иммунизации с использованием клеток в качестве иммуногенов в качестве вспомогательных инъекций использовали суспензию клеток, которая представляла собой PBS, содержащий 5×10^6 клеток. В случае использования белка в качестве иммуногена использовали раствор 5 мкг в PBS.

Полученные лимфоциты смешивали с клеточной линией миеломы мыши (P3-X63-Ag8.653) в соотношении при смешивании 3:1, а затем проводили слияние клеток в соответствии со способом с полиэтиленгликолем. После этого слитые клетки культивировали в течение 7-28 суток в среде с метилцеллюлозой (торговое название: ClonaCell-HY Cloning Medium D; Stem Cell), которая содержала НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Каждую из единичных колоний растущих гибридом отбирали и помещали в 96-луночный планшет с плоским дном и с использованием жидкой селективной среды, содержащей НАТ, гибридомы культивировали в инкубаторе с 5% CO₂. Культуральный супернатант растущих гибридом из единичных колоний подвергали первичному скринингу с помощью Cell ELISA (описанного ниже), а затем вторичному скринингу с помощью анализа FACS с использованием клеток NuH-7-hTROP-2, PK-59, тем самым получив 300 типов гибридом, которые продуцировали моноклональные антитела против hTROP-2, распознающие белки hTROP-2, экспрессируемые на поверхности живых клеток.

Пример 6. Первичный скрининг с использованием Cell ELISA.

Клетки CHO-K1 (отрицательный контроль для hTROP-2; приобретенные от Japan Health Sciences Foundation) и клетки CHO-K1-hTROP-2 (или клетки HUH-7 (отрицательный контроль для hTROP-2, приобретенные от Japan Health Sciences Foundation) и клетки NuH-7-hTROP-2) поочередно инокулировали в 96-луночный культуральный планшет (BD Falcon) с плотностью клеток 3×10^4 клеток/луночка, а затем клетки культивировали в атмосфере с 5% CO₂ при 37°C в течение 1-2 суток. Среду для культивирования клеток удаляли декантацией. После этого клетки промывали ледяным PBS, а затем обрабатывали 4%-ным параформальдегидом в PBS в течение 5 мин для иммобилизации клеток. Клетки промывали PBS, охлажденным на льду, а затем подготавливали планшет для ELISA. После этого проводили ELISA стандартным способом. Конкретные методики описаны ниже.

Сначала проводили блокирование 2%-ным раствором обезжиренного молока в PBS при комнатной температуре в течение от 30 мин до 1 ч. Затем к нему добавляли культуральный супернатант гибридомы, а затем их подвергали реакции при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем полученный материал промывали три раза 0,1%-ным раствором Tween20 в PBS. В качестве вторичного антитела меченное пероксидазой хрена (HRP) антитело против IgG мыши (GE Healthcare Biosciences), разбавленное в 1000 раз блокирующим раствором, добавляли к полученному материалу, а затем подвергали реакции при комнатной температуре в течение 1 ч. После этого полученный материал промывали три раза 0,1%-ным раствором Tween20 в PBS. В реакционный раствор добавляли раствор субстрата TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин: SIGMA) для проведения цветной реакции, а затем реакцию останавливали добавлением 1 М серной кислоты. После этого измеряли поглощение (405 нм) с использованием устройства для считывания микропланшетов Microplate reader Model 550 (BIO RAD). Гибридомы, соответствующие культуральному супернатанту гибридом, проявляющему высокую величину поглощения относительно отрицательного контроля, подвергали крупномасштабному культивированию в 24-луночном планшете с плоским дном, а затем подвергали вторичному скринингу с использованием FACS-анализа.

Пример 7. Вторичный скрининг с использованием FACS-анализа.

Гибридомы, которые были определены как положительные в описанном выше первичном скрининге с использованием Cell ELISA, подвергали вторичному скринингу с использованием FACS-анализа. При оценке клеток гибридомы в качестве отрицательных контрольных клеток использовали клетки NuH-7, которые представляли собой клетки рака печени человека, которые не экспрессируют hTROP-2, и в качестве индикатора использовали реактивность в отношении клеток NuH-7-hTROP-2, которые стабильно экспрессировали hTROP-2. Затем проводили оценку на основе реактивности в отношении клеток PK-59 (RCB1901; приобретенные в клеточном банке RIKEN), которые представляли собой клетки рака поджелудочной железы человека, эндогенно экспрессирующие белок hTROP-2 на клеточной поверхности.

Клетки извлекали из культуральной чашки с помощью обработки трипсином, а затем получали суспензию клеток (плотность клеток: 2×10^6 клеток/мл). Культуральный супернатант гибридом, которые оказались положительными при первичном скрининге с использованием Cell ELISA, подвергали реакции с 100 мкл суспензии клеток при 4°C в течение 20 мин. Реакционную смесь промывали PBS, а затем ее подвергали реакции с меченым PE антителом против IgG мыши (BD Pharmingen) (0,1 мкг) (4°C, 30 мин). После этого реакционную смесь анализировали с использованием FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

В итоге, было установлено приблизительно 300 типов гибридом, которые продуцируют моноклональное антитело против hTROP-2, распознающее белок hTROP-2, экспрессированный на поверхности живых клеток.

Пример 8. Идентификация изотипа.

Изотип продуцированного моноклонального антитела против hTROP-2 идентифицировали с использованием MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY ISOTYPING TEST KIT (Serotec) в соответствии со способом, описанным в упоминаемом выше наборе.

Пример 9. Формирование асцитов и очистка антитела против TROP-2.

Клоны гибридом, полученные описанным выше способом, вводили с плотностью 3×10^6 клонов в брюшную полость мышей BALB/c nude, которым ранее (за семь суток) был введен 2,6,10,14-тетраметилпентадекан (пристан). Через две недели асцитическую жидкость собирали. Более того, эту асцитическую жидкость подвергали осаждению с каприловой кислотой, а затем аффинной очистке с использованием колонки с белком G (HiTrap protein G; GE Healthcare Biosciences) или колонки с белком A (HiTrap protein A; GE Healthcare Biosciences) с получением моноклональных антител против hTROP-2 из отдельных клонов гибридом.

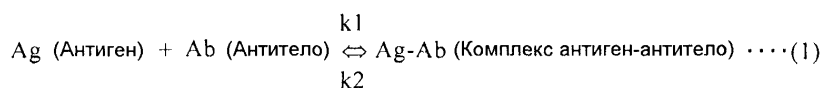
Пример 10. Измерение аффинности связывания антигена (измерение величины Kd).

Аффинность связывания антигена (величину Kd) полученного моноклонального антитела против hTROP-2 вычисляли способом с использованием ELISA (Djavadi-Ohanian L. et al (1996), In Antibody Engineering, Chapter 4, pp. 77-97. IRL Press, Oxford).

В частности, очищенный рекомбинантный белок hTROP-2 (0,1 мкг/мл) добавляли в 96-луночный планшет для культивирования (Corning), чтобы иммобилизовать антиген на твердую фазу (при комнатной температуре в течение 1 ч или при 4°C в течение ночи). Затем полученный планшет промывали PBS три раза, а затем в него добавляли 2%-е обезжиренное молоко (раствор в PBS) для блокирования (при комнатной температуре в течение 1 ч). Полученный планшет промывали PBS два раза. После этого в описанный выше планшет для ELISA добавляли комплекс антиген-антитело, который был ранее получен путем смешения раствора антигена (очищенный белок hTROP-2; 50, 25, 12,5, 6,25 или 3,125 нМ) с каждым клоном (0,5 нМ) моноклонального антитела против hTROP-2, а затем уравнивания смеси, и их подвергали реакции (при комнатной температуре в течение 1 ч). Продукт реакции промывали PBS три раза, а затем его подвергали реакции с меченым HRP антителом против IgG мыши (конечная концентрация: 1 мкг/мл) (GE Healthcare Biosciences), разбавленным блокирующим раствором (при комнатной температуре в течение 1 ч). Затем продукт реакции промывали 0,1%-ным раствором Tween20 в PBS, а затем в полученный планшет добавляли раствор субстрата TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин: SIGMA) для проведения цветной реакции. Затем к продукту реакции добавляли 1 М серную кислоту для завершения реакции. С использованием устройства для считывания планшетов Microplate reader Model 550 (BIO RAD) измеряли поглощение.

Для измерения константы диссоциации (Kd) использовали следующие выражения.

В соответствии с законом действующих масс реакция антиген-антитело представляется с помощью следующих выражений.



$$Kd = k_2/k_1 = \text{Agf} \cdot \text{Abf} / \text{Ag} \cdot \text{Ab} = \text{Agf} \cdot \text{Abf} / x \dots (2)$$

В выражении (2) Agf соответствует концентрации свободного антигена, Abf соответствует концентрации свободного антитела, и Ag·Ab соответствует концентрации комплекса антиген-антитело. Если Ag·Ab=x, то концентрация свободного антитела представляется следующим выражением:

$$\text{Abf} = \text{Abt} - x \dots (3)$$

Таким образом, описанное выше выражение (2) может представлять собой

$$Kd = \text{Agf} \cdot (\text{Abt} - x) / x \dots (4)$$

Если обе стороны выражения (4) умножить на x/Kd·Abt,

$$x / \text{Abt} = \text{Agf} \cdot (1 - x/\text{Abt}) \cdot 1/Kd$$

$$x/\text{Abt} \cdot 1/\text{Agf} = (1 - x/\text{Abt}) \cdot 1/Kd \dots (5)$$

Если X=x/Abt и Y=x/Abt·Agf в выражении (5)

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

Исходя из выражения (6), вычисляли величину Kd.

Величины Kd полученных 300 клонов моноклонального антитела против hTROP-2 измеряли описанным выше способом. В результате 133 клон проявляли величину Kd 1×10^{-10} (М) или менее, 59 клонов проявляли величину Kd 1×10^{-11} (М) или менее, и 2 клон проявляли величину Kd 1×10^{-12} (М) или менее.

Среди моноклональных антител против hTROP-2, которые проявляли активность ингибирования роста опухоли in vivo, были выявлены величины Kd для 5-70 (IgG2a мыши), T6-16 (IgG2a мыши), K5-107 (IgG1 мыши), K5-116-2-1 (IgG1 мыши) и T5-86 (IgG1 мыши), составляющие $6,8 \times 10^{-12}$ (М), $4,3 \times 10^{-12}$ (М), $4,7 \times 10^{-12}$ (М), $2,69 \times 10^{-11}$ (М) и $8,49 \times 10^{-11}$ (М) соответственно (фиг. 1 и табл. 1).

Таблица 1

Величины Kd для моноклональных антител против hTROP-2

№ клона	K5-70	T6-16	K5-107	K5-116-2-1	T5-86
Kd ($\times 10^{-12}$ M)	6,8	4,3	4,7	26,9	84,9

Пример 11. Реактивность моноклональных антител против hTROP-2 в отношении злокачественных клеточных линий человека.

Злокачественные клеточные линии человека (опухолевые клеточные линии человека), использованные в этих исследованиях, были приобретены в Health Science Research Resources Bank (HSRRB), клеточном банке RIKEN (RIKEN), ATCC (American Type Culture Collection), ECACC (European Collection of Cell Cultures) и DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). В частности, использовали следующие клеточные линии: huH-1 (HSRRB), HUH-6 (HSRRB), HuH-7 (HSRRB), JHH-5 (HSRRB), JHH-6 (HSRRB), JHH-7 (HSRRB), HLE (HSRRB), HLF (HSRRB), HepG2 (HSRRB), Alexander (HSRRB), KP-1N (HSRRB), KP-1NL (HSRRB), KP-2 (HSRRB), KP-3 (HSRRB), KP-3L (HSRRB), PK-1 (RIKEN), PANC-1 (RIKEN), MIA PaCa-2 (HSRRB), PK-59 (RIKEN), PK-45H (RIKEN), PK-45P (RIKEN), BxPC-3 (ATCC), SUIT-2 (HSRRB), TCC-PAN2 (HSRRB), SW480 (ATCC), DLD-1 (HSRRB), LoVo (HSRRB), COLO-320 (RIKEN), CACO-2 (RIKEN), CW-2 (RIKEN), HCT 116 (ATCC), HCC-56 (HSRRB), MCF-7 (HSRRB), JIMT-1 (DSMZ), HCC1143 (ATCC), A549 (HSRRB), DU145 (RIKEN) и PC-3 (HSRRB).

Злокачественные клетки извлекали из культуральной чашки с помощью обработки трипсином, а затем получали суспензию клеток (плотность клеток: 2×10^6 клеток/мл). К 100 мкл суспензии клеток добавляли моноклональное антитело против hTROP-2 (0,1 мкг), а затем им позволяли реагировать при 4°C в течение 20 мин. Реакционный раствор промывали PBS, а затем его подвергали реакции с меченным PE антителом против IgG мыши (BD Biosciences Pharmingen) (0,1 мкг) (при 4°C в течение 30 мин). После этого полученный материал анализировали с помощью FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

Все из полученных антител против hTROP-2 не связывались с клеточной линией рака печени человека HuH-7, которая не экспрессировала эндогенно hTROP-2. С другой стороны, антитела против hTROP-2 связывались с клетками HuH-7-hTROP-2, в которых стабильно экспрессировался ген hTROP-2 (фиг. 2). После этого реактивность полученных моноклональных антител против hTROP-2 в отношении клеточных линий злокачественной опухоли человека (в которых на клеточной поверхности эндогенно экспрессировался белок hTROP-2) исследовали с помощью FACS-анализа. В результате все из полученных 300 типов моноклональных антител против hTROP-2 связывались с клеточными линиями рака поджелудочной железы человека (PK-59 и BxPC-3). В частности, все из антител K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 и T5-86, которые проявляли активность ингибирования роста опухоли *in vivo*, связывались со злокачественными клеточными линиями человека на высоких уровнях. Например, по сравнению со случаем, когда злокачественные клеточные линии подвергали реакции только с меченным PE антителом против IgG мыши (BD Biosciences Pharmingen), упомянутые выше антитела проявляли следующую способность связывания в отношении клеток PK-59 и клеток BxPC-3 при средней интенсивности флуоресценции: K5-70 (44 раза), T6-16 (59 раз), K5-107 (89 раз), K5-116-2-1 (122 раза) и T5-86 (15 раз) (для клеток PK-59; фиг. 3); и K5-70 (45 раз), T6-16 (25 раз), K5-107 (90 раз), K5-116-2-1 (121 раз) и T5-86 (10 раз) (для клеток BxPC-3; фиг. 4).

Что касается злокачественных клеточных линий человека, отличных от PK-59 и BxPC-3, среди 12 типов клеточных линий рака поджелудочной железы моноклональные антитела против hTROP-2 связывались с KP-2, KP-3L, PK-1, PK-45H, SUIT-2 и TCC-PAN2 и не связывались с KP-1N, KP-1NL, KP-3, PANC-1 и MIA-PaCa2 (фиг. 5). Среди клеточных линий рака толстого кишечника человека моноклональные антитела против hTROP-2 связывались с CACO-2, SW480, DLD-1 и HCT 116 и не связывались с COLO-320 и CW-2 (фиг. 6). Более того, моноклональные антитела против hTROP-2 связывались с JIMT-1 и HCC1143 (обе из которых представляли собой клеточные линии рака молочной железы человека) и с PC-3 и DU145 (обе из которых представляли собой клеточные линии рака предстательной железы человека). Таким образом, они распознавали белки hTROP-2, эндогенно экспрессирующиеся на клеточной поверхности многих типов злокачественных клеточных линий человека (фиг. 6).

Пример 12. Перекрестная реактивность с белком TROP-2 мыши и белком TROP-1/EpCAM человека.

Для исследования специфичности полученных моноклональных антител реактивность антител в отношении белка TROP-2 мыши, демонстрирующего гомологию 80% на уровне аминокислотной последовательности с белком hTROP-2, и в отношении белка TROP-1/EpCAM, демонстрирующего гомологию 50% на уровне аминокислотной последовательности с белком hTROP-2, исследовали с помощью FACS-анализа.

В частности, каждый из вектора экспрессии (TROP-2 мыши-pcDNA3.1(+), предоставляемый Institute of Molecular and Cellular Biosciences, the University of Tokyo), содержащего полноразмерную кДНК гена TROP-2 мыши (код доступа GenBank № NM_020047, Y08830), и вектора экспрессии (pcDNA3.1-hEpCAM-мус/His), содержащего полноразмерную кДНК гена TROP-1/EpCAM человека (номер доступа GenBank № NM_002354), временно вводили в клетки CHO-K1 с использованием реагента Lipofectamine

2000 (Invitrogen). Через 24-48 ч после этого клетки извлекали из культуральной чашки путем обработки их трипсином, а затем получали суспензию клеток. Полученную таким образом суспензию клеток последовательно подвергали реакции с продуцированным моноклональным антителом против hTROP-2 (0,1 мкг) и с меченым PE антителом против IgG мыши, а затем его анализировали с помощью FACSCalibur.

Антитело T2-102 (IgG1 мыши), использованное в качестве положительного контроля, которое продемонстрировало перекрестную реактивность в отношении TROP-2 мыши, проявляло высокую способность к связыванию клеток CHO-K1, в которых временно экспрессировался ген TROP-2 мыши. С другой стороны, антитела K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 и T5-86 антитела не продемонстрировали какой-либо перекрестной реактивности с TROP-2 мыши (фиг. 7).

Аналогично, моноклональное антитело против EpCAM человека (BD Biosciences Pharmingen), используемое в качестве положительного контроля, проявляло высокую способность к связыванию с клетками CHO-K1, в которых временно экспрессировался EpCAM/TROP-1 человека. С другой стороны, антитела K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 и T5-86 не продемонстрировали такой перекрестной реактивности с EpCAM/TROP-1 человека (фиг. 8).

Указанные выше результаты продемонстрировали, что полученные моноклональные антитела против hTROP-2, и, в частности, антитела K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 и T5-86, которые проявляли противоопухолевую активность *in vivo*, специфично связывались с hTROP-2.

Пример 13. Измерение активности ингибирования роста клеток.

В качестве способа исследования активности моноклонального антитела против hTROP-2 в отношении ингибирования функции hTROP-2 оценивали влияние антитела на рост клеток злокачественной опухоли человека, которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на поверхности клетки, путем измерения количества живых клеток с использованием TetraColor ONE (Seikagaku Corporation). В частности, клетки РК-59 суспендировали в среде RPMI1640, содержащей 0,5%-ную эмбриональную телячью сыворотку (изготовленную BioWest) в концентрации клеток 2×10^5 клеток/мл, а затем 100 мкл полученной суспензии клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного культурального планшета. Затем в лунки добавляли IgG мыши (отрицательный контроль) и моноклональное антитело против hTROP-2 (конечные концентрации: 0,1 и 1 мкг/мл), а затем смеси культивировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 72 ч. В качестве контроля использовали коммерчески доступное моноклональное антитело против hTROP-2 (клон YY01, Santa Cruz). В лунки добавляли TetraColor ONE (Seikagaku Corporation), а затем их подвергали реакции в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 1-2 ч. После завершения реакции 96-луночный культуральный планшет прямо подвергали измерению поглощения при длине волны 490 нм (контрольная длина волны: 655 нм) с использованием устройства для считывания микропланшетов. Эксперимент проводили с использованием 3 лунок для каждой группы. Тест на значимость отличий проводили согласно t-критерию Стьюдента, и в качестве статистически значимого было определено $P < 0,05$.

Среди моноклональных антител против hTROP-2, которые были получены в компании авторов изобретения до настоящего времени, приблизительно 160 клонов исследовали описанным выше способом с точки зрения их эффекта на рост клеток РК-59. В результате было подтверждено, что T6-16, T5-86, K5-70 и K5-107, которые проявляли активность ингибирования роста опухоли *in vivo*, обладают активностью ингибирования роста клеток 20-40% по сравнению с IgG мыши (отрицательный контроль). Стало очевидным, что эти антитела против hTROP-2 обладают активностью связывания белков hTROP-2, которые экспрессируются на поверхности злокачественных клеток человека, нейтрализации белков hTROP-2 и ингибирования роста злокачественных клеток (фиг. 9).

Пример 14. Анализ застания царапины.

Эффект моноклонального антитела против hTROP-2 на миграционную способность злокачественных клеток человека оценивали с помощью анализа застания царапины. Клетки РК-59 суспендировали в среде RPMI1640, содержащей 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку в концентрации клеток 3×10^5 клеток/мл, а затем в каждую лунку 96-луночного культурального планшета добавляли 100 мкл приготовленной суспензии клеток. Когда клетки достигали смыкания монослоя, часть культивируемых в качестве монослоя клеток счищали путем нанесения на планшет царапины в продольном направлении вершущей наконечника. Моноклональное антитело против hTROP-2 и IgG мыши, использованный в качестве отрицательного контроля, добавляли в среду до конечных концентраций 0,1 и 1 мкг/мл соответственно, а затем проводили культивирование в течение 24 ч. Перед добавлением антитела (0 сутки) и после 24 ч культивирования (1 сутки) область со счищенными клетками фотографировали, а затем измеряли расстояние между клетками. Более того, площадь такой счищенной области количественно определяли с использованием программного обеспечения Scion Image. Эксперимент проводили с использованием 8 лунок для каждой группы. Тест на значимость отличий проводили согласно t-критерию Стьюдента, и в качестве статистически значимого было определено $P < 0,05$.

Исследовали эффект антитела hTROP-2 в отношении миграционной способности клеток, оккупирующих царапину. Как в случае анализа ингибирования роста клеток, оценивали антитела, обладающие благоприятными эффектами. В качестве способа оценки клетки фотографировали на 0 сутки (когда добавляли антитело) и на 1 сутки (через 24 ч после добавления антитела), и миграционное расстояние (мкм) и площадь царапины определяли с помощью анализа изображений. В результате, как показано на

фиг. 10, наблюдали очевидные отличия с точки зрения миграционной способности клеток. Антитела Т6-16 и К5-70, которые использовали в данном испытании, имели значительную активность ингибирования роста по сравнению с контролем. Даже в исследовании воспроизводимости наблюдали ту же тенденцию. В частности, Т6-16 имело результат $P < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента), и была выявлена корреляция с испытанием *in vivo*.

Пример 15. Оценка благоприятных эффектов моноклонального антитела против hTROP-2 на имеющих опухоль мышей.

Модель предупреждения.

Клеточные линии рака поджелудочной железы (PK-59 и ВхРС-3), которые экспрессировали hTROP-2, удаляли обработкой клеток трипсином, и к ним добавляли PBS для получения суспензии клеток, имеющей концентрацию 1×10^8 клеток/мл. Полученную таким образом суспензию клеток смешивали с равным количеством матригеля (BD Biosciences Pharmingen) на льду. С использованием шприца 26 G 100 мкл полученной смеси (5×10^6 клеток) инъецировали подкожно в правый бок каждой самки мыши *nude* в возрасте 6 недель (Balb/c, nu/nu). В день трансплантации злокачественных клеток (1 сутки) мышей подразделяли на группы и начинали введение антитела (1, 5 или 10 мг/кг массы тела, внутрибрюшинное введение). После этого введение антитела продолжали с интервалами раз в трое суток. Противоопухолевую активность оценивали на основе частоты образования опухоли и объема опухоли. Объем опухоли вычисляли по следующей формуле.

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = (\text{меньшая ось})^2 \times (\text{большая ось}) \times \pi/6$$

Модель лечения.

Клеточные линии рака поджелудочной железы (PK-59 и ВхРС-3), которые экспрессировали hTROP-2, удаляли обработкой клеток трипсином и к ним добавляли PBS для получения суспензии клеток, имеющей концентрацию 1×10^8 клеток/мл. Полученную таким образом суспензию клеток смешивали с равным количеством матригеля (BD Biosciences Pharmingen) на льду. С использованием шприца 26 G 100 мкл полученной смеси (5×10^6 клеток) инъецировали подкожно в правый бок каждой самки мыши *nude* в возрасте 6 недель (Balb/c, nu/nu). От пяти до шести суток после трансплантации злокачественных клеток мышей объем опухоли которых увеличился до 50-150 мм³ (среднее значение: приблизительно 100 мм³), подразделяли на группы. День, когда мышей подразделяли на группы, определяли как первые сутки (1 сутки) и начинали введение антитела. Антитело вводили внутрибрюшинно с интервалами раз в трое суток (10 мг/кг массы тела). Противоопухолевую активность оценивали путем измерения объема опухоли. Тест на значимость отличий проводили согласно t-критерию Стьюдента, и в качестве статистически значимого было определено $P < 0,05$.

Пример 16. Анализ противоопухолевой активности моноклонального антитела hTROP-2 *in vivo* в модели с ксенотрансплантацией клеток рака поджелудочной железы человека.

Для антитела, используемого для лечения злокачественной опухоли, которое нацелено на hTROP-2, необходимо иметь активность специфического уничтожения опухолевых тканей, экспрессирующих hTROP-2, или ингибирования роста опухоли.

Моноклональные антитела против hTROP-2 (приблизительно 160 клонов), которые были вновь получены в рамках настоящего изобретения, оценивали с использованием моделей лечения с ксенотрансплантатами клеточной линии рака поджелудочной железы PK-59. Клетки PK-59 экспрессируют на их поверхности EpCAM (фиг. 11A), действующий в качестве маркера стволовых клеток рака поджелудочной железы (Chenwei Li, et al. Cancer Res 2007; 67: (3). 1030-1037), и также экспрессируют Р-гликопротеин/MDR1 (фиг. 11B) и ABCG2/CDw333 (фиг. 11C) (Chen, C. J. et al. Cell 47 (3), 381-389 (1986), Allikmets, R., et al. Hum. Mol. Genet. 5 (10), 1649-1655 (1996)), которые представляют собой ABC-транспортеры, связанные с устойчивостью к лекарственным средствам. Кроме того, клетки PK-59 содержат фракцию клеток (8,93%) (фиг. 11D), положительных как по CD24, так и по CD44, что является характерным для стволовых клеток рака поджелудочной железы, и предположительно они являются клеточной линией высокозлокачественного рака поджелудочной железы человека (Chenwei Li, et al. Cancer Res 2007; 67: (3). 1030-1037, Jane E. Visvader и Geoffrey J. Lindeman. Nat Rev Cancer. Vol. 8 (10) :755-68, 2008).

Большинство из вновь полученных приблизительно 160 клонов не проявляли благоприятных эффектов в моделях лечения с ксенотрансплантатом клеток PK-59. Среди таких клонов можно было получить клоны, проявляющие значительную активность ингибирования роста опухоли, а именно клоны К5-70, Т6-16, К5-107, Т5-86 и К5-116-2-1.

В группе введения клона К5-70 (IgG2a мыши) скорость роста опухоли ингибировалась на статистически значимом уровне. На 21 сутки после начала введения (сутки 21) объем опухоли в контрольной группе (N=14) составлял $1200,8 \pm 377,3$ мм³, в то время как объем опухоли в группе введения клона К5-70 составлял $748,7 \pm 162,9$ мм³ ($P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента) (фиг. 12A). Когда объем опухоли во время начала введения антитела определяли как 1,0, объем опухоли на 21 сутки (сутки 21) составлял 7,8 в группе введения клона К5-70, в то время как объем опухоли в контрольной группе составлял 12,5 (фиг. 12A). Масса вырезанной опухоли составляла $0,43 \pm 0,14$ г ($P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента) в

группе введения клона К5-70, в то время как масса вырезанной опухоли в контрольной группе составляла $0,73 \pm 0,26$ г. Таким образом, клон К5-70 проявлял активность ингибирования приблизительно 60% (фиг. 12B).

Аналогично, скорость роста опухоли ингибировалась на статистически значимом уровне даже в группе введения клона К5-107 (IgG1 мыши) (N=8), группе введения клона Т6-16 (IgG2a мыши) (N=8), группе введения Т5-86 (IgG1 мыши) и группе введения клона К5-116-2-1 (IgG2a мыши) (N=8). На 17 сутки после начала введения (сутки 17) объем опухоли в группе введения клона К5-107 (N=8) и в группе введения клона Т6-16 (N=8) составлял $698,2 \pm 175,9$ мм³ (P<0,05 согласно t-критерию Стьюдента) и $707,2 \pm 254,5$ мм³ (P<0,05 согласно t-критерию Стьюдента) соответственно, в то время как объем опухоли в контрольной группе составлял $1039,3 \pm 271,6$ мм³. Аналогично, на 16 сутки после начала введения (сутки 16) объем опухоли клона в группе введения К5-116-2-1 (N=8) составлял $508,5 \pm 225,2$ мм³ (P<0,05 согласно t-критерию Стьюдента), в то время как объем опухоли в контрольной группе (N=8) составлял $797,0 \pm 172,9$ мм³ (фиг. 13).

С другой стороны, в случае клона Т5-86 на 15 сутки после начала введения (сутки 15) объем опухоли в группе введения клона Т5-86 (N=8) составлял $744,1 \pm 289,1$ мм³, в то время как объем опухоли в контрольной группе (N=8) составлял $1033,2 \pm 319,4$ мм³. Таким образом, не было выявлено значимых отличий с точки зрения объема опухоли. Однако при сравнении массы опухоли, измерение которой проводили в тот же день, масса опухоли в группе введения клона Т5-86 составляла $0,44 \pm 0,13$ г (P<0,05 согласно t-критерию Стьюдента), в то время как масса опухоли в контрольной группе составляла $0,62 \pm 0,14$ г. Таким образом, клон Т5-86 проявлял значительную активность ингибирования.

Более того, с точки зрения как объема опухоли, так и массы опухоли соотношение (Т/С) для каждой группы введения клона антитела и контрольной группы в последний день эксперимента представлено в табл. 2 ниже. Как показано в табл. 2, антитело каждого клона проявляло значительную активность ингибирования (Т/С=62%-72%) в каждой группе введения клона антитела.

Таблица 2

Группа	N (количество мышей)	Объем опухоли Т/С (%)	Масса опухоли Т/С (%)
К5-70	14	62,3**	58,8**
К5-107	8	67,2*	65,0*
Т6-16	8	68,0*	64,7*
Т5-86	8	72,0	70,5*
К5-116-2-1	8	63,8*	60,5*

* - P<0,05, ** - P<0,01 (согласно t-критерию Стьюдента).

Более того, анализировали противоопухолевую активность каждого из клонов К5-70, Т6-16 и К5-116-2-1 в моделях предупреждения с ксенотрансплантатами клеточной линии рака поджелудочной железы РК59. После завершения введения каждого клона антитела рост опухоли ингибировался у всех индивидуумов (N=8). На 18 сутки после начала введения (сутки 18) объем опухоли в группе введения клона К5-70 (10 мг/кг массы тела) составлял $62,4 \pm 80,4$ мм³ (P<0,01 согласно t-критерию Стьюдента), в то время как объем опухоли в контрольной группе (N=8) составлял $880,8 \pm 206,4$ мм³. Таким образом, клон К5-70 проявлял активность ингибирования роста опухоли 92,9%. На 28 сутки после начала введения (сутки 28) объем опухоли в группе введения клона Т6-16 (10 мг/кг массы тела) составлял $152,4 \pm 122,3$ мм³ (P<0,01 согласно t-критерию Стьюдента), в то время как объем опухоли в контрольной группе (N=8) составлял $992,3 \pm 250,8$ мм³. Таким образом, клон Т6-16 проявлял активность ингибирования роста опухоли 84,6%. На 20 сутки после начала введения (сутки 20) объем опухоли в группе введения клона К5-116-2-1 (10 мг/кг массы тела) составлял $207,7 \pm 1319,2$ мм³ (P<0,01 согласно t-критерию Стьюдента), в то время как объем опухоли в контрольной группе (N=8) составлял $1159,4 \pm 413,3$ мм³. Таким образом, клон К5-116-2-1 проявлял активность ингибирования роста опухоли 82,1% (фиг. 14 и табл. 3). Более того, во всех экспериментах не было значимых отличий между контрольной группой и группой введения каждого из антител против hTROP-2 с точки зрения изменения средней массы тела на протяжении периода исследования.

С точки зрения как объема опухоли, так и массы опухоли отношение (Т/С) для каждой группы введения клона антитела к контрольной группе в последний день эксперимента представлено в табл. 3 ниже. Как представлено в табл. 3, значимое ингибирование роста опухоли наблюдали в каждой группе введения клона антитела, и особенно значимый эффект, такой как Т/С=10% или менее, был подтвержден в группе введения клона К5-70.

Таблица 3

Группа	N (количество мышей)	Объем опухоли Т/С (%)	Масса опухоли Т/С (%)
К5-70	8	7,1**	5,8**
Т6-16	8	15,3**	10,5**
К5-116-2-1	8	23,2**	21,5**

** - P<0,01 (согласно t-критерию Стьюдента).

Известное антитело против TROP-2 AR47A6.4.2 (патент США № 7420041) проявляло эффект инги-

бирования роста опухоли в дозировке 20 мг/кг в моделях предупреждения с ксенотрансплантатами с использованием различных злокачественных клеточных линий человека. Это антитело против TROP-2 AR47A6.4.2 ингибировало рост опухоли клеточной линии рака поджелудочной железы человека PL45 в процентном отношении практически на 100%. Однако это антитело имело эффект ингибирования опухоли клеточной линии рака поджелудочной железы VхРС-3 в процентном отношении приблизительно 50%, клеточной линии рака предстательной железы РС-3 в процентном отношении приблизительно 40%, клеточной линии рака молочной железы MCF-7 в процентном отношении приблизительно 60% и клеточной линии рака толстого кишечника Colo205 в процентном отношении приблизительно 40%. Напротив, антитело против hTROP-2 по настоящему изобретению, описанное в настоящей заявке, проявляло более высокий эффект ингибирования роста опухоли в дозировке, составляющей половину упомянутой выше дозы (10 мг/кг).

Пример 17. Анализ противоопухолевой активности в моделях с ксенотрансплантатами (модели предупреждения и модели лечения) клеточной линии рака поджелудочной железы человека VхРС-3.

Как и в случае использования описанных выше моделей лечения с ксенотрансплантатами клеточной линии рака поджелудочной железы человека РК-59, анализировали противоопухолевую активность клона K5-70 в моделях предупреждения с ксенотрансплантатами и в моделях лечения с ксенотрансплантатами клеточной линии рака поджелудочной железы человека VхРС-3.

По сравнению с контрольной группой (N=8) рост опухоли в группе введения клона K-70 значительно ингибировался. На 52 сутки (сутки 52) объем опухоли в группе введения K5-70 (N=8) составлял $236,0 \pm 136,4$ мм³, в то время как объем опухоли в контрольной группе (N=8) составлял $616,3 \pm 266,8$ мм³. Таким образом, клон K-70 проявлял эффект ингибирования роста опухоли 61,7% (P<0,01 согласно t-критерию Стьюдента) (фиг. 15).

Из указанных выше результатов стало очевидным, что моноклональное антитело против hTROP-2 проявляет значительную активность ингибирования роста опухоли *in vivo* в отношении по меньшей мере двух типов злокачественных клеток.

Пример 18. Дозозависимая противоопухолевая активность антитела против hTROP-2 (клон K5-70) в моделях предупреждения с ксенотрансплантатом экспрессирующей hTROP-2 клеточной линии рака поджелудочной железы (клетки РК-59).

Для более подробного анализа активности антитела против hTROP-2 в отношении ингибирования роста опухоли *in vivo* проводили дозозависимое исследование. Как представлено на фиг. 16, рост опухоли в случае клеток РК-59 ингибировался дозозависимым образом путем введения K5-70. На 21 сутки после введения антитела (сутки 21) объем опухоли в контрольной группе (N=7) составлял $937,8 \pm 295,3$ мм³. С другой стороны, объем опухоли в группе введения K5-70 (1 мг/кг) (N=8) составлял $493,5 \pm 305,1$ мм³, демонстрируя уровень ингибирования 50%, и объем опухоли в группе введения K5-70 (5 мг/кг) (N=8) составлял $124,7 \pm 89,0$ мм³, демонстрируя уровень ингибирования 90%. Таким образом, стало очевидным, что по сравнению с известным антителом против TROP-2 AR47A6.4.2 (патент США № 7420041) антитело против hTROP-2 по настоящему изобретению проявляет эффект ингибирования роста опухоли *in vivo*, эквивалентный эффекту антитела против TROP-2 AR47A6.4.2 в дозировке, составляющей одну двадцатую от дозировки антитела против TROP-2 AR47A6.4.2, и что оно проявляет более высокий ингибиторный эффект, составляющий 90%, в дозировке, составляющей одну четвертую.

Пример 19.

Анализ эпитопов.

Получение химерного белка TROP-2 человека/мыши.

Ген TROP-2 человека мыши получали способом ПЦР. Праймеры для ПЦР, представленные ниже, конструировали на основе последовательности гена TROP-2 человека и последовательности гена TROP-2 мыши (номер доступа Genbank № NM_020047).

Праймеры для TROP-2-С человека/мыши.

Y606 (прямой): 5'-cctgagcctacgtcgacgaagtgtgctg-3' (SEQ ID NO: 10).

Y607 (обратный): 5'-cgaccacttcgtcgacgctaggctcagg-3' (SEQ ID NO: 11).

Праймеры для TROP-2-А человека/мыши.

Y612 (прямой): 5'-gactgctccacgtgactccaagtgcctg-3' (SEQ ID NO: 12).

Y613 (обратный): 5'-caggcacttggaagtcagcgtggagcagtc-3' (SEQ ID NO: 13).

Праймеры для TROP-2-В человека/мыши.

Y614 (прямой): 5'-ctcgtggacaacgatggcctctacgacccg-3' (SEQ ID NO: 14).

Y615 (обратный): 5'-cgggtcgtagaggccatcgtgtccacagag-3' (SEQ ID NO: 15).

Праймеры для TROP-2-D мыши/человека.

Y608 (прямой): 5'-ccaaagcctgcgctgcgatgagctgtgctgc-3' (SEQ ID NO: 16).

Y609 (обратный): 5'-gcgaccagctcatcgacgcagcaggcttgg-3' (SEQ ID NO: 17).

Праймеры для TROP-2-Е человека/мыши.

Y616 (прямой): 5'-agcttcctatccggtgcactacgagcag-3' (SEQ ID NO: 18).

Y617 (обратный): 5'-ctgctcgtatgtgcaccgcataggaagct-3' (SEQ ID NO: 19).

Праймеры для TROP-2-F мыши/человека.

Y618 (прямой): 5'-gacattaaagcgagtcctattccagggc-3' (SEQ ID NO: 20).

Y619 (обратный): 5'-gccctggaatagagactcgcctttaatgtc-3' (SEQ ID NO: 21).

Праймеры для TROP-2 мыши.

Прямой праймер: 5'-ctactccacccacccctggcg-3' (SEQ ID NO: 22).

Обратный праймер: 5'-ctcagcaagctaggttcgcttctc-3' (SEQ ID NO: 23).

К обратному праймеру для TROP-2 мыши добавляли последовательность, расщепляемую ферментом рестрикции XhoI, за исключением стоп-кодона. Схематическое изображение полученных химерных белков TROP-2 человека/мыши представлено на фиг. 17.

Химерный белок hmTROP-2-A представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида, располагающегося с N-конца до аминокислоты в положении 69 белка hTROP-2, и полипептида, располагающегося с аминокислоты в положении 64 до С-конца белка TROP-2 мыши. Химерный белок hmTROP-2-B представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида, располагающегося от N-конца до аминокислоты в положении 101 белка hTROP-2, и полипептида, располагающегося с аминокислоты в положении 96 до С-конца белка TROP-2 мыши. Химерный белок hmTROP-2-C представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида, располагающегося от N-конца до аминокислоты в положении 145 белка hTROP-2, и полипептида, располагающегося от аминокислоты в положении 140 до С-конца белка TROP-2 мыши. Химерный белок mhTROP-2-D представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида, располагающегося от N-конца до аминокислоты в положении 139 белка TROP-2 мыши, и полипептида, располагающегося от аминокислоты в положении 146 до С-конца белка hTROP-2. Химерный белок mhTROP-2-E представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида, располагающегося от N-конца до аминокислоты в положении 187 белка TROP-2 мыши, и полипептида, располагающегося от аминокислоты в положении 194 до С-конца белка hTROP-2. Химерный белок mhTROP-2-F представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида, располагающегося от N-конца до аминокислоты в положении 227 белка TROP-2 мыши, и полипептида, располагающегося от аминокислоты в положении 234 до С-конца белка hTROP-2.

Векторы экспрессии, используемые для получения описанных выше химерных белков, специально конструировали с помощью следующих способов. Для получения химерного гена hmTROP-2-A ген hTROP-2 использовали в качестве матрицы и ПЦР проводили с использованием прямого праймера для hTROP-2 и праймера для TROP-2-A человека/мыши Y613. Аналогично, ген TROP-2 мыши использовали в качестве матрицы, и ПЦР проводили с использованием праймера для TROP-2-A человека/мыши Y612 и обратного праймера для TROP-2 мыши. Фрагмент ДНК, амплифицированный способом ПЦР, проявляли с использованием акриламидного геля, а затем представляющую интерес полосу извлекали экстракцией. Затем два типа экстрагированных фрагментов ДНК смешивали для получения матрицы, а затем проводили ПЦР с использованием прямого праймера для hTROP-2 и обратного праймера для TROP-2. Продукт ПЦР проявляли с помощью агарозного гель-электрофореза, а затем представляющий интерес фрагмент ДНК экстрагировали. Экстрагированный фрагмент ДНК клонировали в вектор PCR (зарегистрированный торговый знак)-Blunt (Invitrogen) (pCRB-hmTROP-2-A), а затем последовательность гена подтверждали. Вектор экспрессии для клеток животных получали извлечением гена hTROP-2 из pcDNA3.1-hTROP-2-myc/His путем расщепления EcoRI/XhoI, а затем встраивания в него фрагмента EcoRI/XhoI, содержащего химерный ген hmTROP-2-A, полученный из pCRB-hmTROP-2-A (pcDNA3.1-hmTROP-2-A-myc/His). Кроме того, следующие химерные гены получали тем же способом, который описан выше, и конструировали векторы экспрессии: hmTROP-2-B (с использованием прямого праймера для TROP-2 человека, праймера для TROP-2-B человека/мыши Y615, праймера для TROP-2-B человека/мыши Y614 и обратного праймера для TROP-2 мыши), hmTROP-2-C (с использованием прямого праймера для TROP-2, праймера для TROP-2-C человека/мыши Y607, праймера для TROP-2-C человека/мыши Y606 и обратного праймера для TROP-2), mhTROP-2-D (с использованием прямого праймера для TROP-2 мыши, праймера для TROP-2-D мыши/человека Y609, праймера для TROP-2-D мыши/человека Y608 и обратного праймера для TROP-2 человека), mhTROP-2-E (с использованием прямого праймера для TROP-2 мыши, праймера для TROP-2-E мыши/человека Y617, праймера для TROP-2-E мыши/человека Y616 и обратного праймера для TROP-2 человека), mhTROP-2-F (с использованием прямого праймера для TROP-2 мыши, праймера для TROP-2-F мыши/человека Y619, праймера для TROP-2-F мыши/человека Y618 и обратного праймера для TROP-2 человека) (pcDNA3.1-hmTROP-2-B-myc/His, pcDNA3.1-hmTROP-2-C-myc/His, pcDNA3.1-mhTROP-2-D-myc/His, pcDNA3.1-mhTROP-2-E-myc/His и pcDNA3.1-mhTROP-2-F-myc/His).

Установление клеточных линий HEK293, которые конститутивно экспрессируют химерные белки hTROP-2, TROP-2-C человека/мыши и TROP-2-D мыши/человека.

Каждый из описанных выше векторов экспрессии pcDNA3.1-hTROP-2-myc/His, pcDNA3.1-hmTROP-2-C-myc/His и pcDNA3.1-mhTROP-2-D-myc/His вводили в клетки HEK293. Селекцию проводили с использованием антибиотика G418 (Calbiochem), и были установлены клеточные линии HEK293, конститутивно экспрессирующие белок hTROP-2, химерный белок hmTROP-2-C и химерный белок mhTROP-2-D.

Идентифицировали связывающие области моноклональных антител против hTROP-2 K5-70, T5-86, K5-107, T6-4, T6-16 и K5-116-2-1, которые проявляли благоприятные эффекты в моделях лечения с ксе-

нотрансплантатами клеточной линии рака поджелудочной железы PK-59. Сначала исследовали реактивность моноклональных антител против hTROP-2, проявляющих благоприятные эффекты в случае клеток HEK293, которые постоянно экспрессируют химерные белки hmTROP-2-C и mhTROP-2-D, с помощью FACS-анализа (фиг. 18). В результате было выявлено, что K5-70, K5-107, T5-86 и K5-116-2-1 реагировали с hmTROP-2-C, но что эти антитела не реагировали с mhTROP-2-D. С другой стороны, T6-4 и T6-16 реагировали с mhTROP-2-D, но они не реагировали с hmTROP-2-C. Исходя из этих результатов, область связывания каждого из K5-70, K5-107, T5-84 и K5-116-2-1 была ограничена до области, располагающейся от N-конца до аминокислоты в положении 145 hTROP-2, и область связывания каждого из T6-4 и T6-16 была ограничена до области, располагающейся от аминокислоты в положении 146 до аминокислоты в положении 274 hTROP-2 (фиг. 18).

Для более подробного анализа областей связывания получали векторы, используемые для экспрессии химерных белков hmTROP-2-A, hmTROP-2-B, mhTROP-2-E и mhTROP-2-F, и анализировали реактивность химерных белков в отношении моноклональных антител против hTROP-2, проявляющих благоприятные эффекты (фиг. 19). Каждый из вновь полученных векторов экспрессии, которые были предназначены для экспрессии химерных белков, вводили в клетки HEK293, а затем проводили FACS-анализ с использованием клеток, которые временно экспрессировали химерные белки. K5-70, K5-107, T5-86 и K5-116-2-1 реагировали с hmTROP-2-A, но не реагировали с mhTROP-2-B. Все из 6 исследованных типов моноклональных антител реагировали с hTROP-2. Этот результат отчетливо показал, что область связывания K5-70, K5-107, T5-86 и K5-116-2-1 присутствует в области, располагающейся от N-конца до аминокислоты в положении 69 hTROP-2. Более того, T6-4 и T6-16 не реагировали ни с mhTROP-2-E, ни с mhTROP-2-F. Это показало, что эти антитела распознают область, располагающуюся от аминокислоты в положении 146 до аминокислоты в положении 193 hTROP-2.

Пример 20. Иммуногистохимия.

Материалы/способ.

Для иммуногистохимического окрашивания использовали следующие наборы нормальных и злокачественных тканей.

Наборы нормальных тканей человека:

человек, нормальные органы в двух экземплярах (каталожный номер № AB1, Super Bio Chips);

нормальные ткани более чем с одним пятном (каталожный номер № A103(VI), ISU ABXIS).

Наборы тканей рака легкого:

рак легкого человека-метастаз-норма (каталожный номер № CCA3, Super Bio Chips);

ткань карциномы легкого человека с пограничной тканью, очаги 2 областей (каталожный номер № OD-CT-RsLug03-002, Shanghai Outdo Biotech).

Набор тканей рака поджелудочной железы:

ткань карциномы поджелудочной железы монопатологического типа от 60 случаев, очаги 2 областей (каталожный номер № OD-CT-DgPan03-001, Shanghai Outdo Biotech).

Наборы тканей рака печени:

печеночно-клеточная карцинома, степени I-III с контролями в виде нормальной ткани, наборы тканей от 63 случаев (каталожный номер № CS03-01-002U, Cybrdi);

ткань карциномы печени человека монопатологического типа от 30 случаев, очаги 2 областей (каталожный номер № OD-CT-DgLiv02-002, Shanghai Outdo Biotech).

Наборы тканей рака толстого кишечника:

рак ободочной и прямой кишки человека (каталожный номер № CD3, Super Bio Chips);

карцинома толстого кишечника человека с пограничной тканью, очаги 2 областей (каталожный номер № OD-CT-DgCol03-002, Shanghai Outdo Biotech).

Наборы тканей метастаза в лимфатический узел и метастаза в печень рака толстого кишечника:

набор тканей рака толстого и прямого кишечника (толстая и прямая кишка) с согласующимся метастазом в лимфатический узел, 44 случая/99 очага, предметное стекло для исследований (каталожный номер № C0991t, Biomax us);

набор тканей рака толстого и прямого кишечника (толстой и прямой кишки) с согласующимся метастазом в лимфатический узел и нормальной соседней тканью, 43 случая/99 очага (каталожный номер № C0992, Biomax us);

ткань рака толстого кишечника и метастаза в печень (каталожный номер № A203(IV), ISU ABXIS).

Наборы тканей рака молочной железы:

рак молочной железы человека-метастаз-норма (каталожный номер № CBA3, Super Bio Chips);

карцинома молочной железы человека с пограничной тканью, очаги 2 областей (каталожный номер № OD-CT-RpBre03-002, Shanghai Outdo Biotech).

Наборы тканей рака желудка:

рак желудка человека (каталожный номер № CQ1, Super Bio Chips);

карцинома желудка человека с пограничной тканью, очаги 2 областей (каталожный номер № OD-CT-DgStm03-002, Shanghai Outdo Biotech).

Набор тканей злокачественной опухоли пищевода:

злокачественная опухоль пищевода человека (каталожный номер № CR1, Super Bio Chips);
 карцинома пищевода человека с пограничной тканью, очаги 2 областей (каталожный номер № OD-CT-DgEso03-002, Shanghai Outdo Biotech).

Набор тканей рака яичника:

рак яичника человека (каталожный номер № CJ1, Super Bio Chips).

Набор тканей рака предстательной железы:

рак предстательной железы человека-норма (каталожный номер № CA3, Super Bio Chips).

Набор тканей рака мочевого пузыря:

наборы тканей карциномы мочевого пузыря/карцинома переходных клеток, степени I-III с нормальными тканями (каталожный номер № CC12-01-001U, Cybrdi).

Информацию о пациентах и клиническую информацию, касающуюся описанных выше наборов тканей получали из листа данных, прилагаемых к ним, и на домашних страницах отдельных компаний.

Способ иммуногистохимического окрашивания.

После завершения депарафинизации предметные стекла с набором нормальных и злокачественных тканей подвергали обработке протеазой пепсином при 37°C в течение 5 мин. После этого срезы использовали в иммунном окрашивании с использованием моноклонального антитела против hTROP-2. Цветную реакцию проводили с использованием DAB (3,3'-диаминобензидин) в качестве субстрата и в качестве контрастного окрашивания, затем проводили окрашивания ядер с использованием гематоксилина.

Более конкретно, эти действия проводили следующим образом. Погруженный в парафин срез подвергали депарафинизации, а затем подвергали обработке протеазой пепсином (DAKO) при 37°C в течение 5 мин. После активации антигена срез обрабатывали при комнатной температуре в течение 20 мин с использованием раствора, полученного добавлением раствора пероксида водорода к метанолу в конечной концентрации 0,3%, так чтобы устранить эндогенную активность пероксидазы. Полученный материал промывали PBS при комнатной температуре в течение 5 мин два раза, а затем его блокировали при комнатной температуре в течение 30 мин с использованием раствора PBS, содержавшего 1,5%-ную нормальную сыворотку лошади (DAKO), чтобы осуществить блокирование неспецифического связывания в тканях. Затем полученный материал подвергали реакции с моноклональным антителом клона K5-63-17 (конечная концентрация: 10 мкг/мл), которое было разбавлено раствором PBS, содержавшим 1,5%-ную нормальную сыворотку лошади, при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем промывали PBS при комнатной температуре в течение 5 мин три раза. После этого биотинилированное антитело против IgG мыши (Vector), которое было разбавлено в 200 раз раствором PBS, содержавшим 1,5%-ную нормальную сыворотку лошади, подвергали реакции при комнатной температуре в течение 30 мин. Продукт реакции промывали PBS при комнатной температуре в течение 5 мин три раза, и реагент набора Vectastain ABC kit (Vector) смешивали в соответствии с инструкцией, прилагаемой к нему, получая комплекс ABC. Этот комплекс ABC подвергали реакции при комнатной температуре в течение 30 мин. Продукт реакции промывали PBS при комнатной температуре в течение 5 мин три раза, а затем проводили цветное проявление с использованием раствора Histofine Peroxidase Substrate Simple Stain DAB solution (Nichirei Biosciences). После завершения цветного проявления продукт реакции промывали деионизированной водой в течение 5 мин, и ядро окрашивали раствором гематоксилина Майера (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). После этого проводили дегидратацию спиртом с последующим пропитыванием ксилолом и заливкой Entellan New (Merck Japan).

Результаты.

Экспрессия hTROP-2 в нормальных тканях человека.

Профиль экспрессии hTROP-2 в нормальных тканях человека анализировали с использованием моноклонального антитела против hTROP-2 клона K5-63-17. Набор нормальных тканей человека (каталожный номер № AB1, Super Bio Chips) депарафинизировали, а затем подвергали гидрофильной обработке. Затем антиген активировали протеазой пепсином, а затем проводили иммунное окрашивание с использованием моноклонального антитела против hTROP-2 клона K5-63-17 (фиг. 20). В результате, окрашивание наблюдали в коже, пищеводе, почке (кора и мозговое вещество), поджелудочной железе, предстательной железе, мочевом пузыре и миндалинной железе. Большинство окрашенных изображений имело локализацию в клеточной мембране (фиг. 20A, B, C, D, F, G и H), однако экспрессию hTROP-2 частично наблюдали даже в цитоплазме (фиг. 20E и H). С другой стороны, такое окрашивание не наблюдали в сердце, печени, желудке, тонком кишечнике, толстом кишечнике, скелетных мышцах, легком, селезенке, тимусе и т.п. (фиг. 20I и J).

Экспрессия hTROP-2 в тканях злокачественной опухоли человека.

Для исследования экспрессии hTROP-2 (hTROP-2-положительный уровень) в тканях злокачественной опухоли человека наборы тканей злокачественной опухоли различных типов подвергали иммунному окрашиванию с использованием моноклонального антитела против hTROP-2 клона K5-63-17. Срез ткани, в котором окрашивалось 10% или более злокачественных клеток, определяли как положительный по hTROP-2. Результаты окрашивания представлены в табл. 4.

Таблица 4

Ткани злокачественной опухоли	Количество положительных по TROP-2 случаев/общее число случаев	TROP-2-положительный уровень (%)
Рак молочной железы	32/80	40
Рак легкого	53/81	65,4
Рак пищевода	69/90	76,7
Рак желудка	25/90	27,8
Рак толстого кишечника	29/178	16,3
Рак поджелудочной железы	26/62	41,9
Рак печени	7/92	7,61
Рак мочевого пузыря	42/59	71,2
Рак предстательной железы	35/38	92,1
Рак яичника	14/58	24,1

Типичные окрашенные изображения представлены на фиг. 21. Среди типов злокачественной опухоли, для которых анализировали экспрессию hTROP-2, рак предстательной железы имел наиболее высокий положительный уровень (92,1%), и также рак легкого (65,4%), рак пищевода (76,1%), рак мочевого пузыря (71,2%) и т.п. имели высокие положительные уровни. Рак печени имел наиболее низкий положительный уровень (7,61%). На окрашенных изображениях наблюдали, что, как и в случае нормальных клеток, hTROP-2 в высокой степени локализовался на клеточной мембране, даже в случае злокачественных клеток (фиг. 21 А-Е, Н и I). Кроме того, в некоторых случаях hTROP-2 также локализовался в цитоплазме (фиг. 21 А, В, Е и G).

hTROP-2-положительный уровень при раке поджелудочной железы составлял 41,9%. Анализировали взаимосвязь между hTROP-2-положительным уровнем и степенью (степень дифференцировки) рака поджелудочной железы. В результате hTROP-2 экспрессировался с высокой частотой при раке поджелудочной железы высокой степени, а именно с низким уровнем дифференцировки (табл. 5).

Таблица 5

hTROP-2-положительные пятна при раке поджелудочной железы 26/62 (41,94%)

Степень	-	+	Положительный уровень	
I	8	0	0%	
I-II	5	0	0%	
II	19	21	52,5%	
II-III	4	5	55,6%	p<0,01
всего	36	26		

Пример 21. Противоопухолевая активность антитела K5-70 при однократном введении в моделях предупреждения с ксенотрансплантатами клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-59.

Сильная противоопухолевая активность *in vivo* клона K5-70 (IgG2a мыши) проявлялась даже после однократного введения K5-70 в дозировке 10 мг/кг массы тела в моделях предупреждения с ксенотрансплантатами с использованием клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-59. В контрольной группе (IgG мыши, 10 мг/кг массы тела, N=3) образование опухоли наблюдали у всех индивидов, и объем опухоли на 28 сутки после трансплантации клеток (сутки 28) составлял 781,7±74,5 мм³. С другой стороны, в группе, в которой K5-70 вводили только один раз в день трансплантации злокачественных клеток (сутки 1) (10 мг/кг массы тела, N=3), объем опухоли на 28 сутки составлял 144,4±176,9 мм³ (P<0,05 согласно t-критерию Стьюдента), демонстрируя активность ингибирования роста опухоли 81,5% (фиг. 22А). Что касается массы опухоли, масса опухоли в контрольной группе на 28 сутки составляла 0,59±0,06 г. Напротив, масса опухоли в группе введения клона K5-70 составляла 0,07±0,10 г (P<0,01 согласно t-критерию Стьюдента), демонстрируя активность ингибирования 88% (фиг. 22В). Что касается как объема опухоли, так и массы опухоли, образование опухоли полностью ингибировалось у 2 из 3 индивидов в группе введения K5-70 в дозировке 10 мг/кг массы тела на введение (фиг. 22С).

Пример 22. Противоопухолевая активность моноклонального антитела против TROP-2 человека в моделях лечения с ксенотрансплантатами клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480.

Противоопухолевая активность каждого из моноклональных антител против TROP-2 человека (клоны K5-70, K5-116-2-1 и Т6-16) исследовали с помощью моделей лечения с ксенотрансплантатами с использованием клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480. Клетки SW480 (5×10⁶ клеток) подкожно трансплантировали в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid в возрасте 6 недель (1

сутки). Когда объем опухоли достигал 100 мм^3 , проводили распределение на группы (7 или 10 суток). С 7 или 10 суток проводили внутрибрюшинное введение антитела с интервалами введения раз в трое суток. Противоопухолевую активность клона K5-70 и противоопухолевую активность клонов K5-116-2-1 и T6-16 оценивали в независимых исследованиях по отдельности. В исследовании по оценке противоопухолевой активности K5-70 объем опухоли в контрольной группе (IgG мыши (10 мг/кг массы тела), $N=8$) на 44 сутки после трансплантации злокачественных клеток (44 сутки) составил $365,4 \pm 214,6 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухоли в группе введения K5-70 (10 мг/кг массы тела) составил $27,4 \pm 29,4 \text{ мм}^3$ ($P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента), и, таким образом, образование опухоли в значительной степени ингибировалось в группе введения K5-70 (уровень ингибирования: $92,5\%$) (фиг. 23A). Что касается массы опухоли, масса опухоли в контрольной группе составляла $0,11 \pm 0,07 \text{ г}$, в то время как масса опухоли в группе введения K5-70 составляла $0,005 \pm 0,007 \text{ г}$ ($P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента), демонстрируя уровень ингибирования $95,5\%$ (фиг. 23B). В частности, у двух из восьми отдельных мышей в группе введения K5-70 образование опухоли полностью ингибировалось, и присутствие опухоли не подтвердилось.

В исследовании по оценке противоопухолевой активности K5-116-2-1 и T6-16, которые проводили по отдельности, объем опухоли в контрольной группе на 42 сутки составлял $713,8 \pm 354,5 \text{ мм}^3$ ($N=8$). Напротив, объем опухоли в группе введения K5-116-2-1 (10 мг/кг массы тела) составлял $188,9 \pm 97,4 \text{ мм}^3$ ($N=8$, $P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента) (фиг. 24A), и объем опухоли в группе введения T6-16 (10 мг/кг массы тела) составлял $292,8 \pm 199,7 \text{ мм}^3$ ($N=8$, $P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента) (фиг. 25A). Таким образом, две из описанных выше групп введения продемонстрировали уровни ингибирования $73,5$ и $59,0\%$ соответственно. Что касается также массы опухоли, масса опухоли в контрольной группе составляла $0,39 \pm 0,19 \text{ г}$. Напротив, масса опухоли в группе введения K5-116-2-1 составляла $0,10 \pm 0,07 \text{ г}$ ($P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента), и масса опухоли в группе введения T6-16 составляла $0,17 \pm 0,14 \text{ г}$ ($P < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента). Таким образом, две из описанных выше групп введения продемонстрировали уровни ингибирования $72,2$ и $56,4\%$ соответственно (фиг. 24B и 25B).

Пример 23. Дозозависимая противоопухолевая активность клона K5-70 в моделях лечения с ксенотрансплантатами с использованием клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480.

Затем исследовали дозозависимую противоопухолевую активность клона K5-70 (IgG2a мыши) в моделях лечения с ксенотрансплантатами с использованием клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid в возрасте 6 недель. Через десять суток после трансплантации (сутки 10), когда средний объем опухоли достигал 100 мм^3 , мышей распределяли в контрольную группу (IgG мыши, группа введения 10 мг/кг массы тела, $N=8$, $104,4 \pm 17,6 \text{ мм}^3$), группу введения K5-70 (1 мг/кг массы тела) ($N=8$, $104,3 \pm 16,1 \text{ мм}^3$), группу введения K5-70 (5 мг/кг массы тела) ($N=8$, $104,6 \pm 15,9 \text{ мм}^3$) и группу введения K5-70 (10 мг/кг массы тела) ($N=8$, $104,8 \pm 14,9 \text{ мм}^3$). Затем проводили внутрибрюшинное введение с интервалами между введениями трое суток. На 42 сутки объем опухоли в контрольной группе составлял $713,8 \pm 354,5 \text{ мм}^3$. С другой стороны, в группах введения K5-70 наблюдали дозозависимое ингибирование образования опухоли. Таким образом, объем опухоли в группе введения 1 мг/кг массы тела составлял $485,0 \pm 207,3 \text{ мм}^3$ (уровень ингибирования: $32,1\%$), объем опухоли в группе введения 5 мг/кг массы тела составлял $339,5 \pm 253,2 \text{ мм}^3$ (уровень ингибирования: $52,4\%$), и объем опухоли в группе введения 10 мг/кг массы тела составлял $355,4 \pm 202,8 \text{ мм}^3$ (уровень ингибирования: $50,2\%$, $P < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента) (фиг. 26A). Аналогично, что касается массы опухоли на 42 сутки, масса опухоли в контрольной группе составляла $0,39 \pm 0,19 \text{ г}$. С другой стороны, масса опухоли в группе введения K5-70 (1 мг/кг массы тела) составляла $0,24 \pm 0,11 \text{ г}$ (уровень ингибирования: $37,8\%$), масса опухоли в группе введения 5 мг/кг массы тела составляла $0,17 \pm 0,14 \text{ г}$ (уровень ингибирования: $55,8\%$, $P < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента), и масса опухоли в группе введения 10 мг/кг массы тела составляла $0,20 \pm 0,13 \text{ г}$ (уровень ингибирования: $47,1\%$). Таким образом, была подтверждена дозозависимая противоопухолевая активность (фиг. 26B).

Пример 24. Анализ интервалов введения клона K5-70 в моделях лечения с ксенотрансплантатом с использованием клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480.

Затем для анализа оптимальных интервалов введения клона K5-70 (IgG2a мыши) исследовали противоопухолевую активность клона K5-70, когда его вводили один раз в неделю (раз в 7 суток), в моделях лечения с ксенотрансплантатом с использованием клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid в возрасте 6 недель. Через десять суток после трансплантации (сутки 10), когда средний объем опухоли достигал 100 мм^3 , мышей распределяли в контрольную группу (IgG мыши, группа введения 10 мг/кг массы тела, $N=8$, $104,4 \pm 17,6 \text{ мм}^3$) и в группу введения K5-70 (10 мг/кг массы тела, раз в неделю) ($N=8$, $104,3 \pm 16,1 \text{ мм}^3$). Затем проводили внутрибрюшинное введение раз в 7 суток. На 42 сутки объем опухоли в контрольной группе составлял $713,8 \pm 354,5 \text{ мм}^3$, в то время как объем опухоли в группе введения K5-70 (раз в неделю) составлял $323,3 \pm 239,9 \text{ мм}^3$ (уровень ингибирования: 55% , $P < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента) (фиг. 27A). Более того, когда интервал введения возрастал до одного раза в 10 суток и до одного раза в две недели, объем опухоли в контрольной группе на 39 сутки составлял $956,9 \pm 367,8 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухоли в группе введения K5-70 (вводимого раз в 10 суток) на 39

сутки составлял $525,4 \pm 180,6 \text{ мм}^3$ (уровень ингибирования: 45,1%, $P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента), и объем опухоли в группе введения K5-70 (вводимого раз в 14 суток) составлял $459,4 \pm 217,6 \text{ мм}^3$ (уровень ингибирования: 52,0%, $P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента) (фиг. 27B). В документах уровня техники (US 7420040 и US 7420041), когда антитела вводили в моделях лечения с ксенотрансплантатами с использованием клеточной линии рака поджелудочной железы (VxPC-3) в дозировке 20 мг/кг массы тела три раза в неделю (с интервалами введения 2 суток), антитела проявляли противоопухолевую активность с уровнем ингибирования от 50 до 60%. Напротив, антитело K-70 проявляло противоопухолевую активность, эквивалентную антителам уровня техники, в дозировке, равной половине дозировки антител уровня техники (10 мг/кг массы тела), раз в 2 недели (с интервалами введения 12 суток). Если учитывать единичную дозировку и интервалы введения, очевидно, что антитело K5-70 проявляло значительную противоопухолевую активность в общей дозировке, составляющей по меньшей мере одну двенадцатую дозировок антител уровня техники.

Пример 25. Дозозависимая противоопухолевая активность клона T6-16 в моделях лечения с ксенотрансплантатами с использованием клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480.

Затем исследовали дозозависимую противоопухолевую активность клона T6-16 (IgG2a мыши) в моделях лечения с ксенотрансплантатами с использованием клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid в возрасте 6 недель. Через 10 суток после трансплантации (сутки 10), когда средний объем опухоли достигал 100 мм^3 , мышей распределяли в контрольную группу (IgG мыши, группа введения 10 мг/кг массы тела, $N=8$, $105,8 \pm 9,9 \text{ мм}^3$), в группу введения T6-16 (1 мг/кг массы тела) ($N=8$, $104,4 \pm 13,3 \text{ мм}^3$), в группу введения T6-16 (5 мг/кг массы тела) ($N=8$, $104,7 \pm 13,0 \text{ мм}^3$) и в группу введения T6-16 (10 мг/кг массы тела) ($N=8$, $104,8 \pm 12,4 \text{ мм}^3$). Затем проводили внутрибрюшинное введение с интервалами введения раз в трое суток. На 43 сутки объем опухоли в контрольной группе составлял $473,5 \pm 137,0 \text{ мм}^3$. С другой стороны, в группах введения T6-16 наблюдали дозозависимую активность ингибирования образования опухоли. Таким образом, объем опухоли в группе введения 1 мг/кг массы тела составлял $397,9 \pm 97,5 \text{ мм}^3$ (уровень ингибирования: 16,0%), объем опухоли в группе введения 5 мг/кг массы тела составлял $195,9 \pm 89,7 \text{ мм}^3$ (уровень ингибирования: 58,7%, $P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента) и объем опухоли в группе введения 10 мг/кг массы тела составлял $190,2 \pm 56,5 \text{ мм}^3$ (уровень ингибирования: 59,8%, $P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента) (фиг. 28A). Аналогично, что касается массы опухоли на 43 сутки, масса опухоли в контрольной группе составляла $0,19 \pm 0,07 \text{ г}$. С другой стороны, масса опухоли в группе введения T6-16 (1 мг/кг массы тела) составляла $0,2010,08 \text{ г}$, масса опухоли в группе введения 5 мг/кг массы тела составляла $0,08 \pm 0,04 \text{ г}$ (уровень ингибирования: 57,9%, $P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента) и масса опухоли в группе введения 10 мг/кг массы тела составляла $0,09 \pm 0,04 \text{ г}$ (уровень ингибирования: 52,6%, $P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента). Таким образом, была подтверждена дозозависимая противоопухолевая активность (фиг. 28B).

Пример 26. Анализ интервалов введения клона T6-16 в моделях лечения с ксенотрансплантатом с использованием клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480.

Затем для анализа оптимальных интервалов введения клона T6-16 (IgG2a мыши) исследовали противоопухолевую активность клона T6-16, когда его вводили с интервалами введения один раз в неделю (раз в 7 суток) и один раз в 10 суток в моделях лечения с ксенотрансплантатами с использованием клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid в возрасте 6 недель. Через 10 суток после трансплантации (сутки 10), когда средний объем опухоли достигал 100 мм^3 , мышей распределяли в контрольную группу (IgG мыши, группа введения 10 мг/кг массы тела, $N=8$, $105,8 \pm 9,9 \text{ мм}^3$), группу введения T6-16 (10 мг/кг массы тела, один раз в неделю) ($N=8$, $105,0 \pm 11,6 \text{ мм}^3$), группу введения T6-16 (10 мг/кг массы тела, раз в 10 суток) ($N=5$, $130,8 \pm 2,4 \text{ мм}^3$). Затем начинали введение. На 43 сутки объем опухоли в контрольной группе составлял $473,5 \pm 137,0 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухоли в группе введения T6-16 (раз в неделю) составлял $243,7 \pm 65,3 \text{ мм}^3$ (уровень ингибирования: 48,5%, $P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента), и объем опухоли в группе введения T6-16 (раз в 10 суток) составлял $297,8 \pm 54,4 \text{ мм}^3$ (уровень ингибирования: 37,1%, $P < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента) (фиг. 29). В документах уровня техники (US 7420040 и US 7420041), когда антитела вводили в моделях лечения с ксенотрансплантатами с использованием клеточной линии рака поджелудочной железы (VxPC-3) в дозировке 20 мг/кг массы тела три раза в неделю (с интервалами введения 2 суток), антитела проявляли противоопухолевую активность с уровнем ингибирования 50-60%. Напротив, было выявлено, что антитело T6-16 проявляет значительную противоопухолевую активность, когда его вводили в дозировке, составляющей половину дозировки антитела уровня техники раз в 10 суток (с интервалами введения 8 суток). Если учитывать единичную дозировку и интервалы введения, очевидно, что антитело T6-16 проявляло значительную противоопухолевую активность в общей дозировке, составляющей по меньшей мере одну восьмую дозировок антител уровня техники.

Пример 27. Анализ противоопухолевой активности клона K5-70 в моделях предупреждения с ксенотрансплантатами с использованием клеточной линии рака предстательной железы человека DU-145.

Противоопухолевую активность клона K5-70 в отношении рака предстательной железы человека

оценивали в моделях предупреждения с ксенотрансплантатами с использованием клеток DU-145 (RIKEN Cell Bank, RCB2143). Клетки DU-145 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали каждой из самок мышей nude в возрасте 6 недель (Balb/c, nu/nu). День, когда проводили трансплантацию, определили как 1 сутки. Мышей распределяли в контрольную группу (N=8) и группу введения K5-70 (N=8). Начиная с 1 суток, K-70 внутривенно вводили мышам с частотой раз в 3 суток в дозировке 10 мг/кг массы тела. На 40 сутки объем опухоли в контрольной группе составлял $368,2 \pm 307,8 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухоли в группе введения K5-70 составлял $30,6 \pm 29,6 \text{ мм}^3$ ($P < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента), демонстрируя активность ингибирования образования опухоли приблизительно 90% (фиг. 30А). Что касается массы опухоли, далее наблюдали значительную противоопухолевую активность. Масса опухоли в контрольной группе на 40 сутки составляла $0,18 \pm 0,18 \text{ г}$. Напротив, в группе введения K5-70 опухоли исчезали у всех из 8 отдельных мышей, и, таким образом, образование опухоли полностью ингибировалось (фиг. 30В). Из упомянутых выше результатов, очевидно, что моноклональное антитело против TROP-2 человека клон K5-70 демонстрирует высокую противоопухолевую активность, даже в отношении рака предстательной железы человека.

Пример 28. Активность ингибирования метастазирования клон K5-70 в моделях метастазов в печень с использованием клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-59.

Метастазирование злокачественной опухоли является важным фактором, который влияет на клинический прогноз при лечении желудочно-кишечного рака. Контроль метастазов является в значительной степени терапевтически важным. Если можно было подавлять не только образование опухоли, а также метастазирование злокачественной опухоли в другие органы путем введения антитела для применения в терапии злокачественной опухоли, которое нацелено на TROP-2, можно ожидать высокой клинической пользы. Таким образом, это является желательным свойством в качестве терапевтического антитела против злокачественной опухоли.

Экспрессия TROP-2 была подтверждена во многих типах карцином. Было описано, что TROP-2 экспрессировался на высоком уровне, в частности, в метастатических очагах (Br. J. Cancer (2008); 99: 1290-1295, Clin. Cancer Res. (2006); 12: 3057-3063, Mod. Pathol. (2008); 21: 186-191). Более того, также было описано, что, когда злокачественные клетки с введенным геном TROP-2 трансплантировали мышам nude путем введения через селезенку или через поджелудочную железу, встречаемость метастазов в печень возрастала (WO 2010/089782, Molecular Cancer (2010); 9: 253), и, таким образом, в этом сообщении было сделано предположение о важности TROP-2 в процессе метастазирования злокачественной опухоли. Однако до настоящего времени отсутствовали сообщения, конкретно описывающие, что антитело, которое нацелено на TROP-2, обладает действием ингибирования метастазов *in vivo*.

Моноклональное антитело против hTROP-2 мыши K5-70, которое было открыто в рамках настоящего изобретения, проявляет высокие терапевтические эффекты в моделях с ксенотрансплантатами, где подкожно трансплантировали клетки рака поджелудочной железы. С помощью анализа застарания царапин, проведенного *in vitro*, было продемонстрировано, что антитело K5-70 способно подавлять способность к миграции клеток рака поджелудочной железы PK-59 в дополнение к эффекту подавления роста злокачественных клеток. Таким образом, было сделано предположение, что антитело K5-70 может ингибировать метастазирование злокачественной опухоли *in vivo*. Таким образом, исследовали эффект ингибирования метастазирования моноклонального антитела мыши против hTROP-2 с использованием моделей, в которых клетки рака поджелудочной железы PK-59 инъецировали в селезенку мышей nude, так чтобы развивался метастаз в печень.

Клеточную линию рака поджелудочной железы (PK-59), эндогенно экспрессирующую hTROP-2, собирали обработкой трипсином, а затем приготавливали суспензию клеток в PBS в количестве 2×10^7 клеток/мл. Суспензию клеток хранили на льду до трансплантации. Каждую из самок мышей nude в возрасте 6 или 7 недель (Balb/c, nu/nu) подвергали анестезии путем внутривенного введения пентобарбитала и под анестезией вырезали 10-15 мм с их левого бока. Селезенку извлекали из брюшной полости, а затем в селезенку инъецировали 50 мкл суспензии клеток (1×10^6 клеток) с использованием шприца 26G. Через четыре минуты после инъекции клеток селезенку лигировали шелковыми швами 5-0, а затем селезенку вырезали. Разрез брюшной полости закрывали шелковыми швами 5-0, а затем хирургическую область закрывали с помощью Wound Clips (AUTOCLIP 9 мм, Becton Dickinson). За сутки до трансплантации злокачественных клеток мышей распределяли на группы. Моноклональное антитело против hTROP-2 (K5-70) или контрольное антитело (очищенный IgG мыши) внутривенно вводили мышам в дозировке 10 мг/кг массы тела. Кроме того, через семь суток после трансплантации злокачественных клеток такое антитело вводили аналогично тому, как описано выше. Через от четырех до шести недель после трансплантации злокачественных клеток мышей подвергали эвтаназии путем смещения шейных позвонков. Затем из каждой мыши вырезали печень и подтверждали присутствие или отсутствие метастатических очагов.

В контрольной группе, в которой мышам вводили IgG мыши, у 4 из 6 мышей, которым трансплантировали клетки PK-59, наблюдали заметные метастатические очаги (2-7 очагов) вокруг доли печени от четырех до шести недель после трансплантации (фиг. 31А, встречаемость метастазов: 67%, табл. 6). Напротив, у четырех мышей в группе введения K5-70, которым трансплантировали клетки PK-59, такие

метастатические очаги не наблюдали в печени всех из мышей, и таким образом, встречаемость метастазов составляла 0% (фиг. 31В, табл. 6).

Таблица 6

Эффект подавления метастазирования клона K5-70 в моделях метастазирования в печень, полученных путем трансплантации через селезенку клеток РК-59 мышам nude

Группа введения	Недели после трансплантации	Индивидуальный №	Количество метастатических очагов	Определение метастаза
Контрольная группа	4W	C-1	0	-
	4W	C-2	5	++
	6W	C-3	7	++
	6W	C-4	7	++
	6W	C-5	2	+
	6W	C-6	0	-
Среднее количество метастатических очагов			3,5	Встречаемость метастазов 67%
Группа введения K5-70	4W	K-1	0	-
	6W	K-2	0	-
	6W	K-3	0	-
	6W	K-4	0	-
Среднее количество метастатических очагов			0	Встречаемость метастазов 0%

Из этих результатов очевидно, что антитело против hTROP-2 K5-70 обладает высоким ингибиторным действием в отношении метастазов в печень клеток рака поджелудочной железы РК-59.

Пример 29. Противоопухолевая активность антитела K5-70 в моделях с ксенотрансплантатами с использованием клеточной линии рака толстого кишечника SW480, которые представляют собой модели рецидивирующей злокачественной опухоли после введения иринотекана гидрохлорида.

В последние годы было разработано много химиотерапевтических средств для подавления роста злокачественных клеток в качестве терапевтических лекарственных средств. Эти лекарственные средства достигли определенных результатов лечения. Однако эти химиотерапевтические средства являются проблематическими с точки зрения побочных эффектов, связанных с их подавляющим рост действием в отношении нормальных клеток, отличных от злокачественных клеток, и рецидива злокачественной опухоли после приостановки лечения. Таким образом, если бы можно было подавить рецидив опухоли после завершения лечения химиотерапевтическими средствами путем введения терапевтического антитела против злокачественной опухоли, нацеленного на TROP-2, можно было бы ожидать высокой клинической пользы. Таким образом, это является желаемым свойством для терапевтического антитела против злокачественной опухоли.

В качестве лекарственного средства от рака толстого кишечника в дополнение к 5-FU и содержащим платину лекарственным средствам с недавних пор в клинических учреждениях применяют иринотекана гидрохлорид (Irinotecan, Daiichi Sankyo Co., Ltd.), который имеет ингибиторный эффект топоизомеразы. Что также касается моделей на животных, был описан противоопухолевый эффект иринотекана гидрохлорида в моделях на мышах, которым трансплантировали различные типы опухолевых клеток, включая клетки рака толстого кишечника в качестве типичного примера (Cancer Chemother Pharmacol. (1991); 28(3):192-8). Таким образом, был исследован эффект антитела против hTROP-2 клона K5-70 (IgG2a мыши) в отношении предупреждения рецидива опухоли после введения иринотекана гидрохлорида в моделях с ксенотрансплантатами с использованием клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали в правый бок самок мышей NOD-scid в возрасте 8 недель. Через 11 суток после трансплантации (сутки 11), когда средний объем опухоли достигал 100 мм^3 , мышам распределяли на группу без введения (группа введения нормального солевого раствора, N=8, $130,7 \pm 16,2 \text{ мм}^3$) и группу введения иринотекана гидрохлорида (CPT-11, Irinotecan, Daiichi Sankyo Co., Ltd.) (N=16, $123,0 \pm 21,4 \text{ мм}^3$). После этого мышам внутривенно вводили иринотекана гидрохлорид в дозировке 40 мг/кг массы тела, один раз в 3 суток, всего 3 раза (11, 14 и 17 сутки). На третьи сутки после последнего введения иринотекана гидрохлорида (20 суток) объем опухоли в группе без введения достигал $232,1 \pm 21,1 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухоли в группе введения иринотекана гидрохлорида составлял $126,6 \pm 26,6 \text{ мм}^3$ ($P < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента), и, таким образом, наблюдали заметный эффект подавления опухоли. На этой стадии группу иринотекана гидрохлорида подразделяли на две группы на основе размера опухоли. Одну группу определили как группа вве-

дения K5-70 (10 мг/кг массы тела) (N=8, объем опухоли на 20 сутки: $126,0 \pm 28,0$ мм³), а другую группу определили как группа введения IgG мыши (10 мг/кг массы тела) (N=8, размер опухоли на 20 сутки: $127,2 \pm 27,0$ мм³). Внутривентральное введение и измерение объема опухоли проводили в каждой группе раз в 3 суток, с тем чтобы оценить возникновение рецидива опухоли (фиг. 32). В группе введения IgG мыши, начиная с 18 суток после последнего введения иринотекана гидрохлорида (35 сутки), было выявлено несколько мышей, имеющих заметную рецидивирующую опухоль объемом более 300 мм³. На 30 сутки после последнего введения иринотекана гидрохлорида (47 сутки) наблюдали опухоль объемом более 300 мм³ у 5 из 8 мышей (средний объем опухоли: $401,7 \pm 172,7$ мм³). Напротив, в группе введения K5-70 рецидив опухоли значительно подавлялся, и средний объем опухоли составлял $180,5 \pm 142,1$ мм³ ($P < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента) (фиг. 32). В частности, в группе введения K5-70 объем опухоли на 47 сутки стал меньше, чем объем опухоли, когда мышам распределяли на группы ($126,0 \pm 28,0$ мм³). Объем опухоли становился меньше 100 мм³ у 4 из 8 животных. Из этих результатов стало очевидно, что антитело против hTROP-2 K5-70 имеет крайне высокое подавляющее действие на рецидивирующую опухоль после введения иринотекана гидрохлорида.

Пример 30. Картирование эпитопов с использованием технологии CLIPS.

Материалы и способы.

Синтез пептидов.

15-мерные и 30-мерные линейные пептиды, происходящие из внеклеточных доменов TROP-2, которые использовали в этом эксперименте, получали путем твердофазного синтеза согласно способу с Fmoc (9-флуоренилметоксикарбонил). Кроме того, для анализа прерывистых эпитопов синтезировали 17-мерные пептиды, происходящие из внеклеточного домена TROP-2, на оба конца которых были добавлены остатки цистеина, и конформацию, имеющую одну или две структуры петель, реконструировали с помощью технологии CLIPS (технология химически связанных пептидов на каркасе). Когда другой остаток цистеина присутствовал вблизи добавленного остатка цистеина, его заменяли аланином.

ELISA для скрининга эпитопов.

5034 типа синтезированных пептидов ковалентно связывали с картами PEPSCAN (455 пептида/карта), а затем анализировали связывание синтезированных пептидов с антителами способом ELISA. Картам PEPSCAN позволяли реагировать с моноклональными антителами против TROP-2 человека (K5-70, K5-107, K5-116-2-1, T5-86 и T6-16), разбавленными до концентрации 1 мкг/мл блокирующим буфером (фосфатный буфер, содержащий 4%-ную сыворотку лошади, 5%-ный овальбумин и 1%-ный Tween). После промывания полученному материалу позволяли реагировать с разбавленным в 1000 раз комплексом пероксидазы-вторичное антитело при 25°C в течение 1 ч. После промывания к реакционному раствору добавляли раствор субстрата (раствор, содержащий 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолина сульфат (ABTS) и 2 мкл 3%-ного раствора пероксида водорода), а затем проводили хромогенную реакцию в течение 1 ч. Активность связывания антител количественно определяли путем фотографирования с помощью камеры CCD, а затем проведения анализа изображений.

Результаты.

Моноклональные антитела против TROP-2 человека K5-70, K5-107, K5-116-2-1, T5-86 и T6-16, которые проявляли благоприятные эффекты, подвергали анализу эпитопов с использованием технологии CLIPS (химически связанные пептиды на каркасе). Следует отметить, что термин "номер аминокислоты" используют в настоящих примерах для обозначения номера аминокислоты в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 (белок hTROP-2 (323 аминокислотных остатка)).

Результат анализа антитела K5-70 представлен в табл. 7 ниже. В результате было выявлено, что 33 пептида проявляют высокую активность связывания с антителом K5-70. В этих 33 пептидах неоднократно присутствовала последовательность, содержащая VCSPDGPGRQCRCALGSGMAVD (номера аминокислот 43-65) (пептиды № 1-7 и 9 в табл. 7), последовательность, содержащая HHILIDLRHRPTAG (номера аминокислот 152-165) (пептиды № 14, 22-25, 28, 29, 31 и 33 в табл. 7), последовательность, содержащая VHYEQPTIQIELRQ (номера аминокислот 193-206) (пептиды № 8, 10, 12, 13, 15, 18, 20, 21, 23, 26, 28, 30 и 32 в табл. 7), и последовательность, содержащая DAELRRLFRER (номера аминокислот 171-183) (пептиды № 11, 12, 14, 16, 18, 19, 21, 22, 25, 29 и 31 в табл. 7). Антитело K5-70 особенно сильно связывалось с последовательностью, содержащей VCSPDGPGRQCRCALGSGMAVD. Из этих результатов было предположено, что в белке hTROP-2 упомянутые выше 4 типа областей последовательностей пептидов, вероятно, являются эпитопами антитела K5-70.

Таблица 7

Связывание антитела K5-70 с пептидами CLIPS, происходящими из внеклеточных доменов TROP-2 человека

номер	пептид	связывание K5-70
1	NKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCST	2742
2	TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTS	2604
3	TNKM TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	2562
4	MTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT	2402
5	KMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTL	1770
6	PTNNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDC	1391
7	VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK	932
8	CAAVHYEQPTIQELRCAAVHYEQPTIQELRC	876
9	CPTNKM TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD	839
10	CVHYEQPTIQELRQNCVHYEQPTIQELRQNC	825
11	HSDLD AELRLFRERCHSDLD AELRLFRERC	725
12	RLFRERYRLHPKFAAVHYEQPTIQELRQ	687
13	AVHYEQPTIQELRQ	642
14	CAGAFNHSDLD AELRCHHILIDLRHPTAGAC	624
15	CPKFVAAVHYEQPTIQCGDLRVRGEPQVERC	579
16	CHSDLD AELRLFRERCGLDLRV	538
17	FQGRGGDLRVRGEP	538
18	CVHYEQPTIQELRQNCGLDL AELRLFRERYRC	524
19	CHSDLD AELRLFRERCGRGEPLQ	519
20	CTIQELRQNTSQKAACVHYEQPTIQELRQNC	513
21	CVHYEQPTIQELRQNCCHSDLD AELRLFRERC	511
22	CHHILIDLRHPTAGACHSDLD AELRLFRERC	489
23	CHHILIDLRHPTAGACVHYEQPTIQELRQNC	489
24	CHHILIDLRHPTAGACGLDLRVRGEPQVERC	488
25	CDAELRLFRERYRLHCDLVTRTHHILIDLRHC	483
26	CVHYEQPTIQELRQNC	483
27	CAFNHSDLD AELRLFRVHYEQPTIQELRQNC	478
28	CVHYEQPTIQELRQNCCHHILIDLRHPTAGAC	473
29	CDAELRLFRERYRLHCDLVTRTHHILIDLRHC	472
30	VHYEQPTIQELRQNCGLDLRVRGEPQVERC	470
31	CDELVRTHHILIDLRHCDLD AELRLFRERC	469
32	AVHYEQPTIQELRQCAVHYEQPTIQELRQC	468
33	CHSDLD AELRLFRERCDELVRTHHILIDLRHC	466

Результат анализа для антитела K5-107 представлен в табл. 8 ниже. В результате было выявлено, что последовательность, содержащая VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD (номера аминокислот 43-65), содержалась в 10 из 20 пептидов (пептиды № 1-6, 8, 13, 14 и 17 в табл. 8) (табл. 8).

Таким образом, было предположено, что в белке hTROP-2 упомянутая выше область последовательности пептида, состоящая из VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD, может представлять собой эпитоп антитела K5-107.

Таблица 8

Связывание антитела K5-107 с пептидами CLIPS, происходящими из внеклеточных доменов TROP-2 человека

номер	пептид	связывание K5-107
1	TNKM TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	2763
2	NKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCST	2761
3	KMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTL	2752
4	MTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT	2726
5	CPTNKM TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD	2723
6	TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTS	2720
7	TCPTNKM TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAV	2716
8	VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK	2689
9	CSPDGPGRGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKC	2655
10	CTCPTNKM TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMA	2655
11	NCTCPTNKM TVCSPDGPGGRCQCRALGSGM	2207
12	DNCTCPTNKM TVCSPDGPGGRCQCRALGSG	1816
13	TNKM TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	1525
14	CTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKC	1118
15	QDNCTCPTNKM TVCSPDGPGGRCQCRALGS	874
16	SPDGPGRGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKCL	561
17	CTNKM TVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDASTC	380
18	TVCSPDGPGGRCQCR	312
19	CAPKNARTLVRPSEHACARTLVRPSEHALVDNC	284
20	HSDLD AELRLFRERCHSDLD AELRLFRERC	272

Результат анализа антитела K5-116-2-1 представлен в табл. 9 ниже. В этом анализе три типа пептидных последовательностей, а именно последовательность, содержащая VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD (номера аминокислот 43-65) (пептиды № 1-7, 15 и 25 в табл. 9), последовательность, содержащая NHILIDLRHPTAG (номера аминокислот 152-165) (пептиды № 8-11, 16, 17, 19, 20, 22-24 и 27-29 в табл. 9), и последовательность, содержащая DLDAELRLFRER (номера аминокислот 171-183) (пептиды № 11-14, 17, 19, 21, 23 и 29 в табл. 9), появлялись несколько раз (табл. 9). Таким образом, было предположено, что в белке hTROP-2 эти три типа областей последовательности пептида могут представлять собой эпитопы антитела K5-116-2-1.

Таблица 9

Связывание антитела K5-116-2-1 с пептидами CLIPS, происходящими из внеклеточных доменов TROP-2 человека

номер	пептид	связывание K5-116-2-1
1	TVSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLS	2672
2	NKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCST	2613
3	TNKMTCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	2482
4	MTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT	2440
5	KMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTL	2423
6	CPTNKMTCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVD	2136
7	PTNKMTCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDC	1723
8	CAGAFNHSDLAELRRCHHILDLRHRPTAGAC	1643
9	CTHHILDLRHRPTAGC	1586
10	CVHYEQPTIQIELRQNCCHHILDLRHRPTAGAC	1504
11	CHHILDLRHRPTAGCHSDLAELRRLFRERC	1475
12	HSDLAELRRLFRERCHSDLAELRRLFRERC	1467
13	CDALRRLFRERYLRHCHSDLAELRRLFRERC	1462
14	CDALRRLFRERYLRHCPK	1442
15	VCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK	1432
16	DLRLCDELVRTHHILDLRHRPTAGAFNH	1421
17	CDELVRTHHILDLRHCDLAELRRLFRERYRC	1392
18	CFQGRGGDLRVGEP	1376
19	CDALRRLFRERYLRHCDLVRTHHILDLRHCH	1366
20	CGDLRVGEPQLQVERCHHILDLRHRPTAGAC	1342
21	CHSDLAELRRLFRERCHSDLAELRRLFRERC	1331
22	CDELVRTHHILDLRHCHHILDLRHRPTAGAC	1323
23	CDALRRLFRERYLRHCDLVRTHHILDLRHCH	1266
24	CHHILDLRHRPTAGACRGEPLQVERTLIYYLC	1229
25	CSPDGPGGRCQCRAL	1227
26	CTVASPDGPGGRAQARCVHYEQPTIQIELRQNC	1223
27	CHHILDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	1222
28	LSRLCDELVRTHHILDLRHRPTAGAFNH	1220
29	CDELVRTHHILDLRHCHSDLAELRRLFRERC	1205

Результаты анализа для антител T5-86 и T6-16 представлены в табл. 10 и 11 ниже соответственно. В этих анализах антитела сильно связывались с пептидом, содержащим последовательность, состоящую из DPEGRFKARQCN (номера аминокислот 109-120). Упомянутая выше пептидная последовательность содержалась в 22 из 26 пептидов, связывающихся с антителом T5-86 (пептиды № 1-3, 5-8, 10-13, 15-19 и 21-26 в табл. 10), и она содержалась в 4 из 26 пептидов, связывающихся с антителом T6-16 (пептиды № 1, 2, 9 и 13 в табл. 11) (табл. 10 и 11). Более того, в анализе, касающемся антитела T5-86, помимо последовательности, содержащей DPEGRFKARQCN (номера аминокислот 109-120), несколько раз встречалась последовательность, содержащая VCSPDGPGGRCQCR (номера аминокислот 43-56) (пептиды №4, 14 и 20 в табл. 10). Более того, в анализе, также касающемся антитела T6-16, несколько раз была найдена другая последовательность, содержащая HHILDLRHRPTAG (номера аминокислот 152-165) (пептиды № 4-8, 10-12, 19, 21, 23, 25 и 26 в табл. 11). Таким образом, было предположено, что в белке hTROP-2 два типа областей последовательности пептида, а именно DPEGRFKARQCN (номера аминокислот 109-120) и VCSPDGPGGRCQCR (номера аминокислот 43-56), могут быть эпитопами антитела K5-86. Также было предположено, что в белке hTROP-2 два типа областей последовательности пептида, а именно DPEGRFKARQCN (номера аминокислот 109-120) и HHILDLRHRPTAG (номера аминокислот 152-165), могут представлять собой эпитопы антитела T6-16.

Таблица 10

Связывание антитела T5-86 с пептидами CLIPS, происходящими из внеклеточных доменов TROP-2 человека

номер	пептид	связывание T5-86
1	CYDPDADPEGRFKARQCADPEGRFKARQANQTC	2306
2	PDCEPGRFKARQCN	2292
3	CADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC	2287
4	VCSPDGPGGRCQCRAL	2263
5	CYDPDADPEGRFKARQCPDADPEGRFKARQANC	2260
6	CADPEGRFKARQANQCTCDPDADPEGRFKARQC	2240
7	CADPEGRFKARQANQTCYDPDADPEGRFKARQC	2208
8	DCEPGRFKARQCNQ	2150
9	CTVASPDGPGGRAQARCHSDLAELRRLFRERC	2086
10	CDADPEGRFKARQANQCDADPEGRFKARQANQC	2035
11	DGRFKARQANQTSVAWCARTLVRPSEHALVDNC	2019
12	DADPEGRFKARQANQCPDADPEGRFKARQANC	1980
13	CPDADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC	1950
14	CSPDGPGGRCQCRAL	1946
15	CEGRFKARQANQTSVACEGRFKARQANQTSVAC	1895
16	CTVASPDGPGGRAQARCPDADPEGRFKARQANC	1890
17	CGLYDPDADPEGRFKACPDADPEGRFKARQANC	1857
18	DPDCEPGRFKARQCNQTSVCWCNVSQVGR	1850
19	CPEGRFKARQANQTSVCDLVRHHILDLRHCH	1841
20	CPDGPGGRAQARALGCHSDLAELRRLFRERC	1830
21	CTLVRPSEHALVDNDGGRFKARQANQTSVAWC	1820
22	CPDADPEGRFKARQANCYDPDADPEGRFKARQC	1795
23	CGLYDPDADPEGRFKACPEGRFKARQANQTSVC	1793
24	YDPDCEPGRFKARQ	1775
25	CPDADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANQTC	1773
26	CDPEGRFKARQCNQTC	1772

Таблица 11

Связывание антитела Т6-16 с пептидами CLIPS, происходящими
из внеклеточных доменов TROP-2 человека

номер	пептид	связывание Т6-16
1	CVNSVGVRRTDKGDLSPCDYPDADPEGRFKARQC	1072
2	CSVGVRRTDKGDLRLCYDPDADPEGRFKARQC	786
3	HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC	714
4	CDELVRTHHILIDLRHCDLDAELRRLFRERC	713
5	CVNSVGVRRTDKGDLSRCDELVRTHHILI	688
6	VRRTDKGDLRLCDELVRTHHILIDLRHRP	670
7	CVERTLIYYDEIPPCKHHILIDLRHPTAGAC	626
8	CHHILIDLRHPTAGACHSDLDAELRRLFRERC	620
9	CVNSVGVRRTDKGDLSCPDADPEGRFKARQANC	611
10	CVHYEQPTQIELRQNCCHHILIDLRHPTAGAC	602
11	VGVRRTDKGDLRLCDELVRTHHILIDLRH	601
12	CAGAFNHSDLDAELRCHHILIDLRHPTAGAC	592
13	CSVGVRRTDKGDLRLCPDADPEGRFKARQANC	585
14	CVRPSEHALVDNDGLYCSVGVRRTDKGDLRLC	573
15	CDALRRLFRERYRLHCHSDLDAELRRLFRERC	566
16	CSVGVRRTDKGDLRLCNDGLYPDADPEGRFC	559
17	CVNSVGVRRTDKGDLSCLGYDPDADPEGRFKAC	553
18	CDLDAELRRLFRERYRCHSDLDAELRRLFRERC	534
19	CDELVRTHHILIDLRHCHHILIDLRHPTAGAC	534
20	CAGAFNHSDLDAELRRCDLDAELRRLFRERYR	529
21	CDALRRLFRERYRLHCDLVRTHHILIDLRHC	527
22	CVHYEQPTQIELRQNCDLDAELRRLFRERYR	526
23	CHHILIDLRHPTAGACVHYEQPTQIELRQNC	524
24	CGVRRTDKGDLRLADCGVRRTDKGDLRLADC	524
25	CGDLRLVRGEPQLVERCHHILIDLRHPTAGAC	521
26	CDLDAELRRLFRERYRCDLVRTHHILIDLRHC	516

Пример 31. Секвенирование переменных областей генов антител мыши против TROP-2 человека (клоны K5-70, K5-107, K5-116-2-1 и T6-16).

Общую РНК экстрагировали из 3×10^6 гибридом, продуцирующих моноклональное антитело мыши против TROP-2, с использованием реагента TRIzol (Invitrogen). Что касается клона K5-70, клона K5-107 и клона K5-116-2-1, кДНК синтезировали с использованием набора для амплификации кДНК SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit (Clontech) в соответствии со способом, включенным в набор, с использованием праймера, специфичного к Н-цепи IgG мыши (5'-TCCAAGTTT-3' (SEQ ID NO: 24)), и праймера, специфичного к L-цепи IgG мыши (5'-GCTGTCCTGATC-3' (SEQ ID NO: 25)). Что касается клона T6-16, кДНК синтезировали с использованием набора GeneRacer kit (Invitrogen) в соответствии со способом, включенным в набор, с использованием праймера oligo-dT. Каждый из генов, кодирующих вариабельные области (VH, VL) Н- и L-цепей клона K5-70 (IgG2a мыши), клона K5-107 (IgG1 мыши) и клона K5-116-2-1 (IgG2a мыши), клонировали способом ПЦР с использованием в качестве матрицы кДНК, синтезированной, как описано выше. В этом процессе в качестве 5'-праймера использовали смесь 10×Universal Primer A Mix (UPM), включенную в набор для амплификации кДНК SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit. С другой стороны, в качестве 3'-праймера для амплификации VH использовали праймер, имеющий последовательность, специфичную к Н-цепи IgG мыши, и в качестве 3'-праймера для амплификации VL использовали праймер, имеющий последовательность, специфичную к L-цепи IgG мыши.

5'-праймер (10 × Universal Primer A Mix (UPM)):

Длинный (0,4 мкм)

5' - CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT - 3' (SEQ

ID NO: 26)

Короткий (2 мкм)

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

3'-праймер (R-праймер):

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

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

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

С использованием каждого из описанных выше праймеров ПЦР проводили со следующим составом реакционного раствора и условиями реакции. Кроме того, R-праймер для амплификации кДНК VH получали путем смешения двух из описанных выше последовательностей друг с другом в эквимольном соотношении, а затем использовали.

Состав реакционного раствора

ДНК-матрица	2,5 мкл
5 × буфер PrimeSTAR (Mg ²⁺ plus)	10 мкл
2,5 mM dNTP	4 мкл
ДНК-полимераза PrimeSTAR HS (2,5 Е/мкл)	0,5 мкл
10 × Universal Primer A Mix (UPM)	5 мкл
R-праймер (10 мкМ)	1 мкл
Стерилизованная вода	27 мкл
Всего	50 мкл

Условия реакции.

Реакцию проводили при 94°C (10 с), а затем проводили цикл, состоящий из "денатурации нагреванием/диссоциации при 98°C (10 с)→отжига при 60°C (5 с)→синтеза/элонгации при 72°C (60 с)" всего 30 раз. Наконец, реакцию проводили при 72°C (3 мин).

Синтезированные кДНК VH и VL субклонировали в вектор pMD20-T (Takara bio Inc.) и определяли их нуклеотидные последовательности. Нуклеотидные последовательности множества клонов VH и клонов VL декодировали, и идентифицировали нуклеотидные последовательности, специфичные к вариабельным областям Н-цепи и L-цепи мыши. На фиг. 33 и 34 представлены консенсусные нуклеотидные последовательности кДНК VH и VL K5-70 и предполагаемые аминокислотные последовательности. На фиг. 35 и 36 представлены консенсусные нуклеотидные последовательности кДНК VH и VL K5-107 и предполагаемые аминокислотные последовательности. На фиг. 37 и 38 представлены консенсусные нуклеотидные последовательности кДНК VH и VL K5-116-2-1 и предполагаемые аминокислотные последовательности.

Гены, кодирующие вариабельные области (VH, VL) Н- и L-цепей клона Т6-16, клонировали способом ПЦР с использованием в качестве матрицы кДНК, синтезированной как описано выше. В этом процессе в качестве 5'-праймера использовали праймер, включенный в набор GeneRacer. С другой стороны, в качестве 3'-праймера для амплификации VH использовали праймер, имеющий последовательность, специфичную к Н-цепи IgG мыши, и в качестве 3'-праймера для амплификации VL использовали праймер, имеющий последовательность, специфичную к L-цепи IgG мыши.

5'-праймер (F-праймер):

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

3'-праймер (R-праймер):

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

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

С использованием каждого из описанных выше праймеров проводили ПЦР со следующим составом реакционного раствора и условиями реакции.

Состав реакционного раствора

ДНК-матрица	1,0 мкл
5 × буфер PrimeSTAR (Mg ²⁺ plus)	10 мкл
2,5 mM dNTP	4 мкл
ДНК-полимераза PrimeSTAR HS (2,5 Е/мкл)	0,5 мкл
F-праймер (10 мкМ)	3 мкл
R-праймер (10 мкМ)	1 мкл
Стерилизованная вода	30,5 мкл
Всего	50 мкл

Условия реакции.

Проводили цикл, состоящий из "денатурации нагреванием/диссоциации при 98°C (10 с)→отжига при 57°C (10 с)→синтеза/элонгации при 72°C (60 с)" всего 35 раз.

Синтезированные кДНК VH и VL субклонировали в вектор pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) и определяли их нуклеотидные последовательности. Нуклеотидные последовательности множества клонов VH и клонов VL декодировали, и идентифицировали нуклеотидные последовательности, специфичные к вариабельным областям Н-цепи и L-цепи мыши. На фиг. 39 и 40 представлены консенсусные нуклеотидные последовательности кДНК VH и VL Т6-16 и предполагаемые аминокислотные последовательности.

Промышленная применимость.

Настоящее изобретение способно обеспечить антитело, которое специфично реагирует с hTROP-2 и обладает высокой противоопухолевой активностью *in vivo*, и, в частности, моноклональное антитело, обладающее высокой противоопухолевой активностью *in vivo* в низкой дозе. Кроме того, настоящее изобретение способно обеспечить гибридому, которая продуцирует антитело, фрагмент антитела, комплекс антитела или сходные с ними и различных типов лекарственных средств, фармацевтическую композицию для диагностики или лечения опухоли, способ детекции опухоли и набор для детекции или диагностики опухоли.

Список последовательностей, свободный текст

SEQ ID NO: 3	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 4	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 5	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 6	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 7	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 8	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 9	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 10	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 11	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 12	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 13	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 14	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 15	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 16	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 17	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 18	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 19	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 20	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 21	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 22	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 23	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 24	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 25	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 26	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 27	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 28	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 29	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 30	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 31	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 32	Синтетическая ДНК
SEQ ID NO: 33	Синтетическая ДНК

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело против TROP-2 человека, которое обладает противоопухолевой активностью *in vivo*, где

аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи антитела представляют собой SEQ ID NO: 36-38 соответственно, и

аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи антитела представляют собой SEQ ID NO: 41-43 соответственно.

2. Антитело по п.1, которое проявляет 50% или более активности ингибирования роста опухоли при дозировке 5-20 мг/кг массы тела.

3. Антитело по п.2, где максимальная частота введения для проявления активности ингибирования роста опухоли составляет один раз в неделю.

4. Антитело по п.1, которое проявляет активность ингибирования роста опухоли 50% или более при однократном введении антитела в дозировке 10 мг/кг массы тела.

5. Антитело по любому из пп.1-4, которое обладает противоопухолевой активностью в отношении двух или более типов опухолевых клеточных линий человека.

6. Антитело по любому из пп.1-5, у которого константа диссоциации (величина K_d) составляет $1,0 \times 10^{-10}$ М или менее.

7. Антитело по любому из пп.1-6, которое представляет собой моноклональное антитело.

8. Антитело по любому из пп.1-7, где опухоль выбрана из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека.

9. Антитело по любому из пп.1-7, где опухоль представляет собой рак поджелудочной железы человека.

10. Антитело по любому из пп.1-9, где опухоль представляет собой рецидивирующий рак или метастазирующий рак.

11. Антитело по любому из пп.5-10, где опухолевые клеточные линии представляют собой клеточные линии по меньшей мере двух типов, выбранных из группы, состоящей из клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-59, клеточной линии рака поджелудочной железы человека BxPC-3, клеточной линии рака поджелудочной железы человека KP-3L, клеточной линии рака поджелудочной железы человека KP-2, клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-1, клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-45H, клеточной линии рака поджелудочной железы человека PK-45P, клеточной линии рака поджелудочной железы человека TCC-PAN2, клеточной линии рака поджелудочной железы человека SUII-2, клеточной линии рака толстого кишечника человека CACO-2, клеточной линии рака толстого кишечника человека SW480, клеточной линии рака толстого кишечника человека DLD-1, клеточной линии рака толстого кишечника человека HCT 116, клеточной линии рака молочной железы человека JMT-1, клеточной линии рака молочной железы человека HCC1143, клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7, клеточной линии рака предстательной железы человека DU145 и клеточной линии рака предстательной железы человека PC-3.
12. Антитело по любому из пп.5-10, где опухолевые клеточные линии представляют собой клеточную линию рака поджелудочной железы человека PK-59 и клеточную линию рака поджелудочной железы человека BxPC-3.
13. Антитело по любому из пп.1-12, которое представляет собой рекомбинантное антитело.
14. Антитело по п.13, где рекомбинантное антитело представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или антитело человека.
15. Антитело по п.14, в котором V-область H-цепи химерного антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35 или последовательности аминокислот в положениях 20-134 последовательности SEQ ID NO: 35, и V-области L-цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40 или последовательности аминокислот в положениях 21-127 в последовательности SEQ ID NO: 40.
16. Выделенное моноклональное антитело против TROP-2 человека, которое продуцируется гибридомой с номером доступа FERM BP-11251.
17. Выделенный фрагмент антитела, происходящий из антитела по любому из пп.1-16, который содержит CDR 1-3 V-области H-цепи с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 36-38 и CDR 1-3 V-области L-цепи с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 41-43.
18. Фрагмент антитела по п.17, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 или последовательность, состоящую из аминокислот в положениях 20-134 последовательности SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или последовательности, состоящую из аминокислот в положениях 20-127 последовательности SEQ ID NO: 40.
19. Гибридома с номером доступа FERM BP-112 51, продуцирующая моноклональное антитело против TROP-2 человека по п.16.
20. Конъюгат антитело-лекарственное средство, который содержит антитело по любому из пп.1-16 и вещество, обладающее противоопухолевой активностью и/или активностью, вызывающей гибель клеток.
21. Конъюгат фрагмент антитела-лекарственное средство, который содержит фрагмент антитела по любому из пп.17 или 18 и вещество, обладающее противоопухолевой активностью и/или активностью, вызывающей гибель клеток.
22. Конъюгат по п.20 или 21, где опухоль выбрана из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека.
23. Конъюгат по п.20 или 21, где опухоль представляет собой рак поджелудочной железы человека.
24. Конъюгат по любому из пп.20 или 21, где опухоль представляет собой рецидивирующую злокачественную опухоль или метастазирующую злокачественную опухоль.
25. Фармацевтическая композиция для лечения опухоли, которая содержит, по меньшей мере, антитело по любому из пп.1-21, или фрагмент антитела по любому из п.17 или 18, или конъюгат по любому из пп.20-24, или их комбинацию.
26. Композиция по п.25, где опухоль выбрана из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека.

27. Композиция по п.25 или 26, где опухоль представляет собой рецидивирующую злокачественную опухоль или метастазирующую злокачественную опухоль.

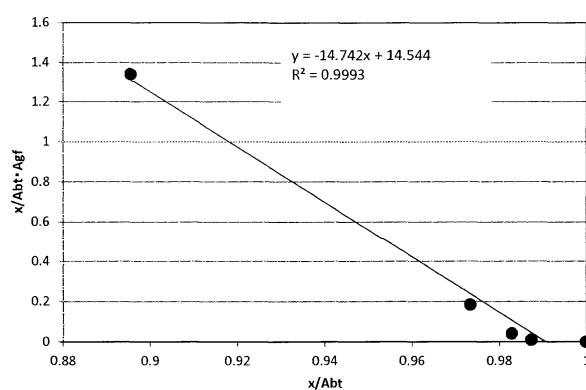
28. Лекарственное средство против опухоли, которое содержит, по меньшей мере, антитело по любому из пп.1-21, или фрагмент антитела по любому из пп.17 или 18, или конъюгат по любому из пп.20-24, или их комбинацию.

29. Лекарственное средство по п.28, где опухоль выбрана из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека.

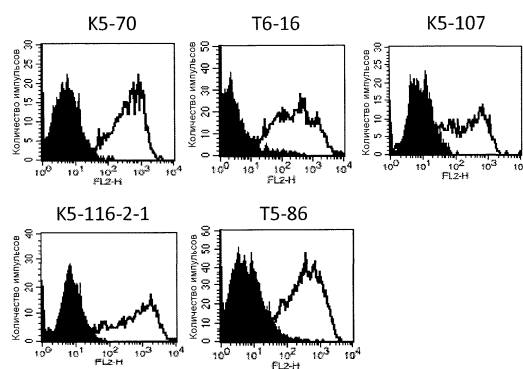
30. Средство для диагностики опухоли, отличающееся тем, что содержит, по меньшей мере, антитело по любому из пп.1-21, фрагмент антитела по любому из пп.17 или 18 или конъюгат по любому из пп.20 и 21.

31. Диагностическое средство по п.30, где опухоль выбрана из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака предстательной железы человека, рака толстого кишечника человека и рака молочной железы человека.

Аффинность

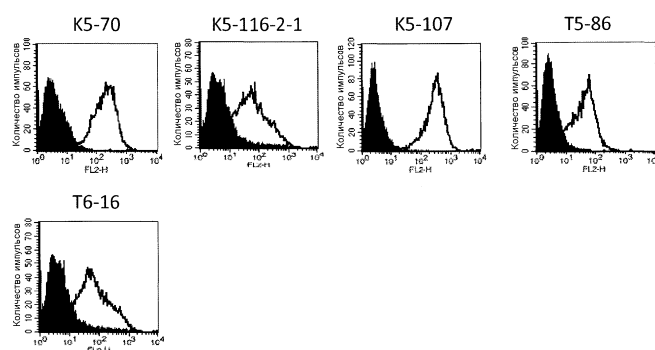


Фиг. 1



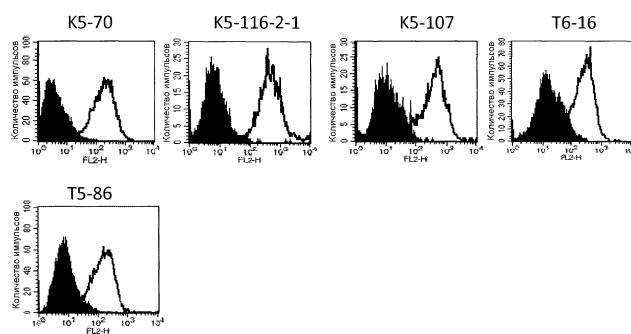
Фиг. 2

PK-59



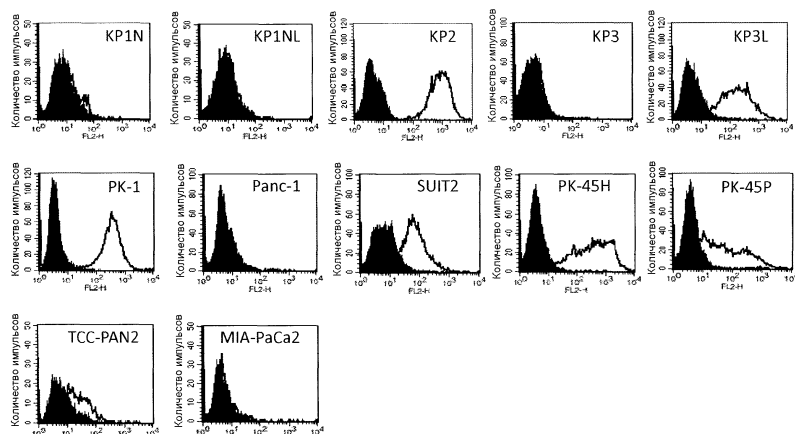
Фиг. 3

BxPC-3



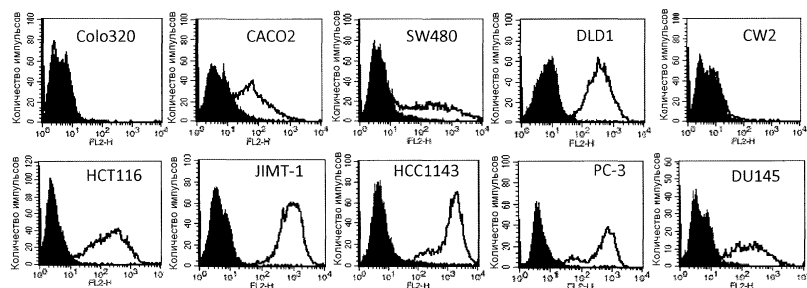
Фиг. 4

Другие злокачественные клеточные линии



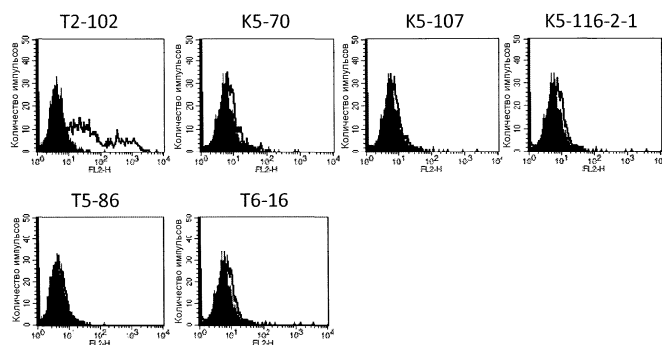
Фиг. 5

Другие злокачественные клеточные линии



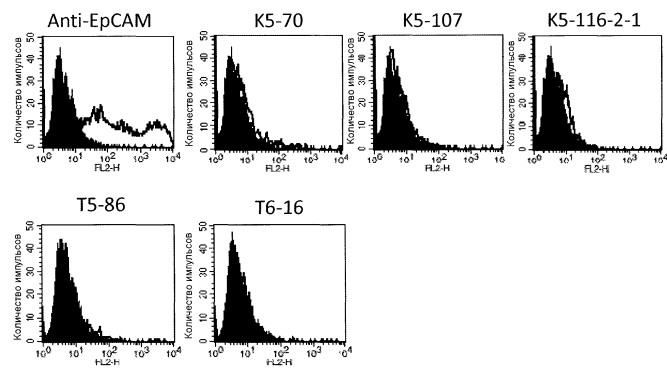
Фиг. 6

Реактивность в отношении TROP-2 мыши

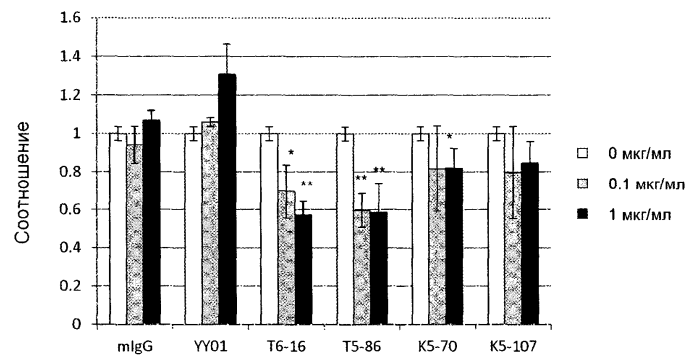


Фиг. 7

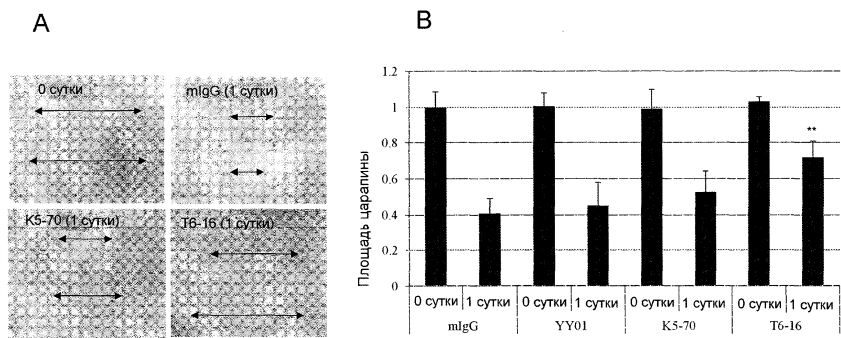
Реактивность в отношении EpCAM/hTROP-1



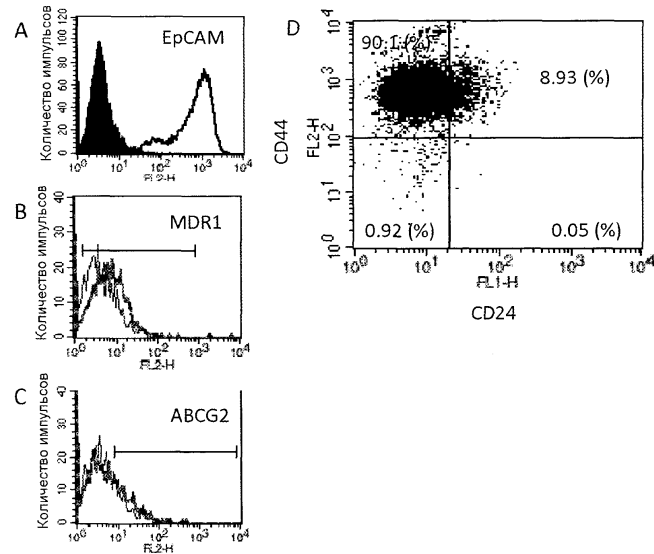
Фиг. 8



Фиг. 9

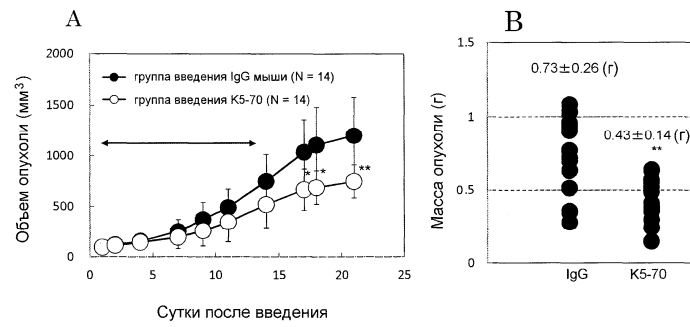


Фиг. 10

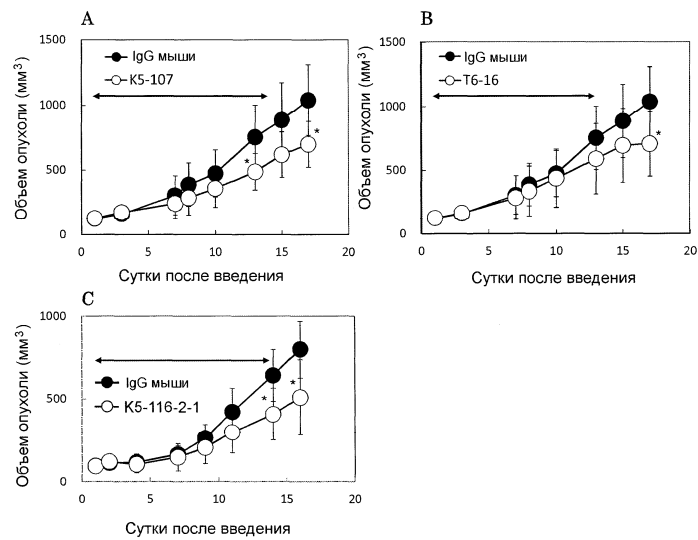


Фиг. 11

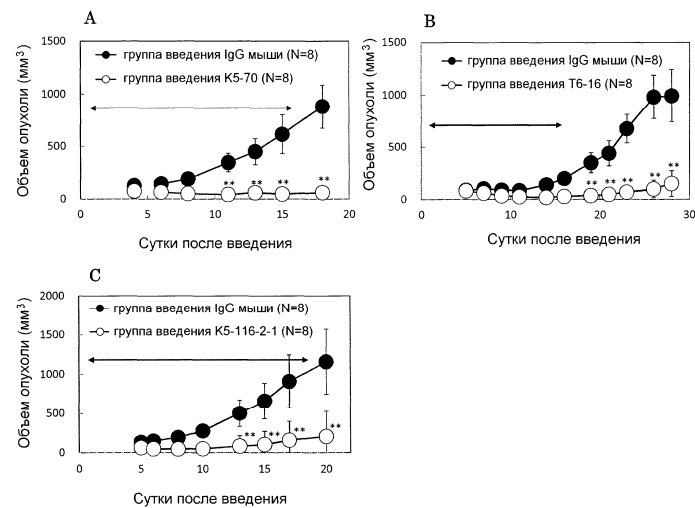
K5-70/лечение



Фиг. 12

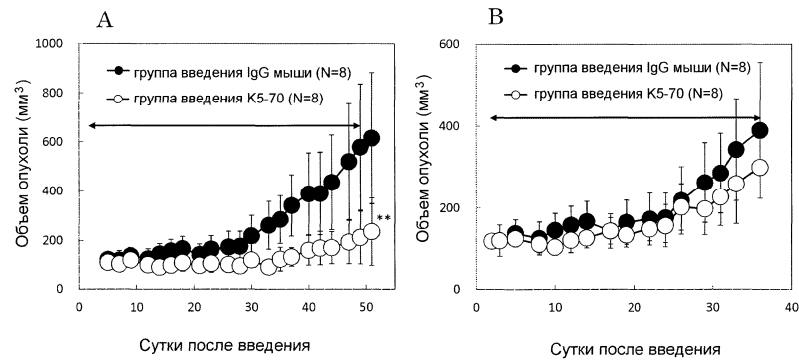


Фиг. 13



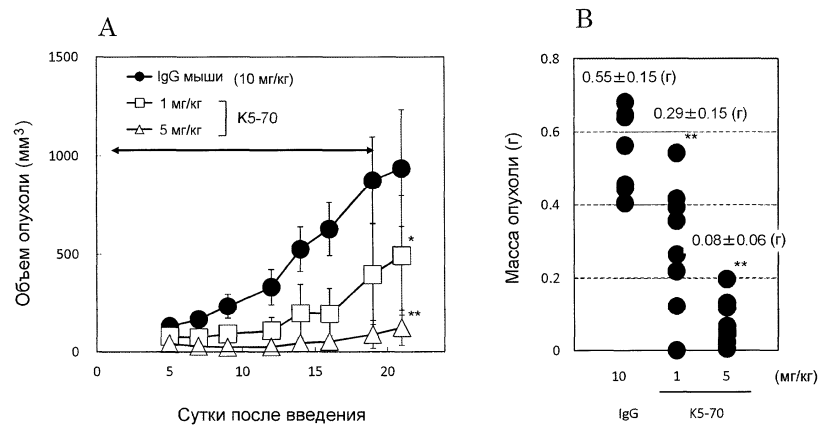
Фиг. 14

K5-70 /BxPC-3

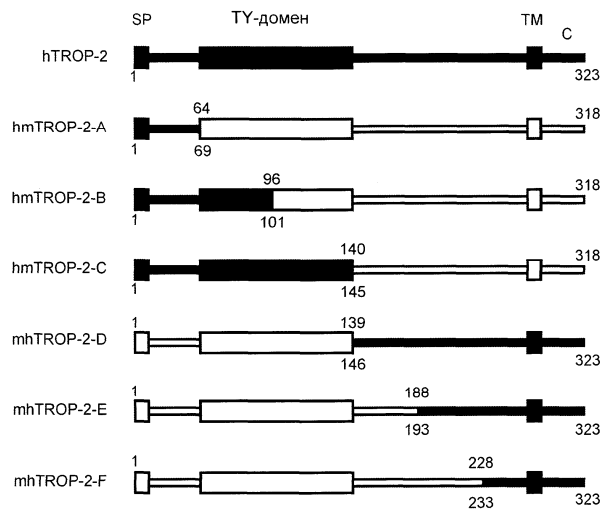


Фиг. 15

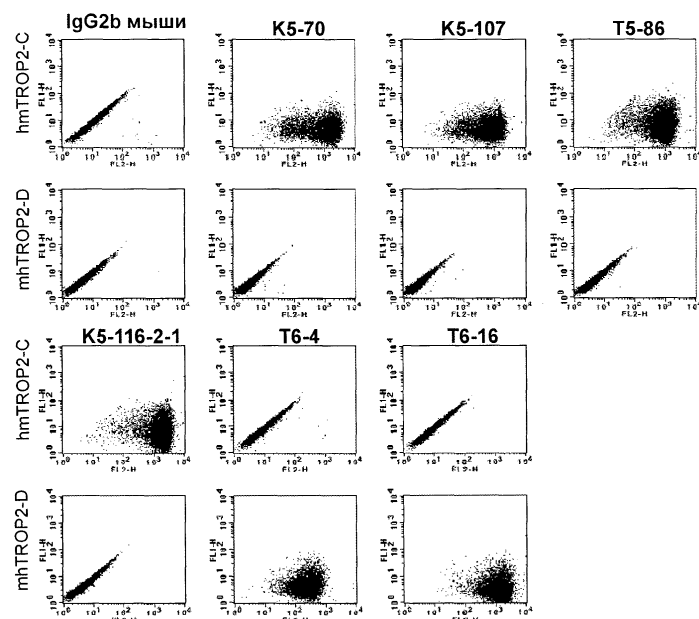
K5-70/дозозависимое предупреждение



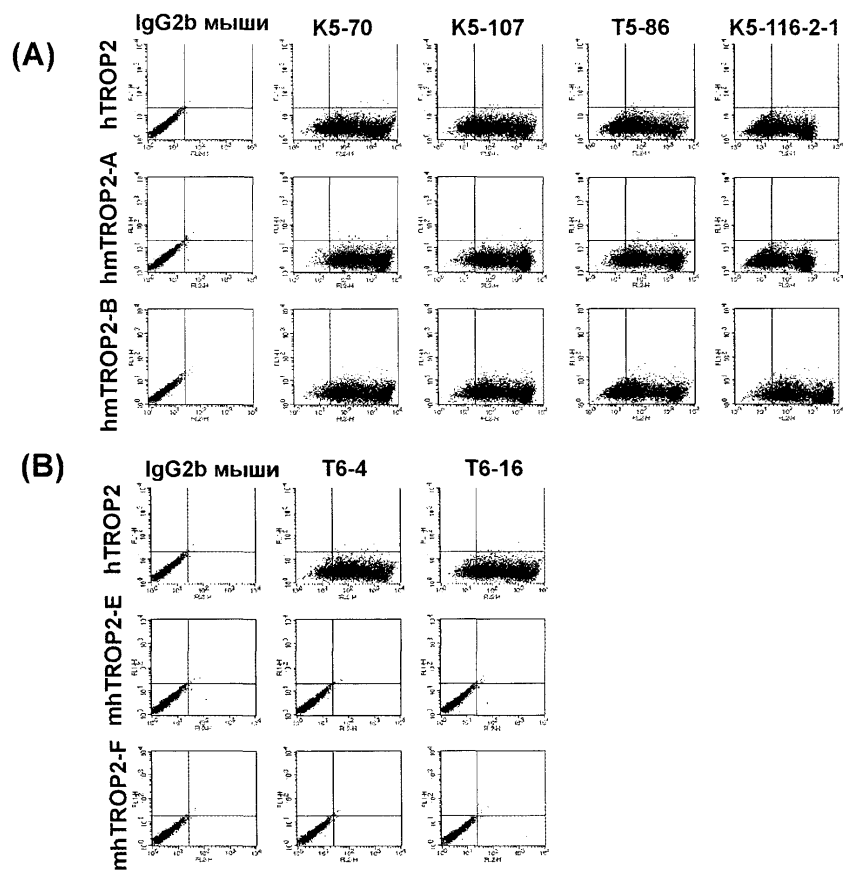
Фиг. 16



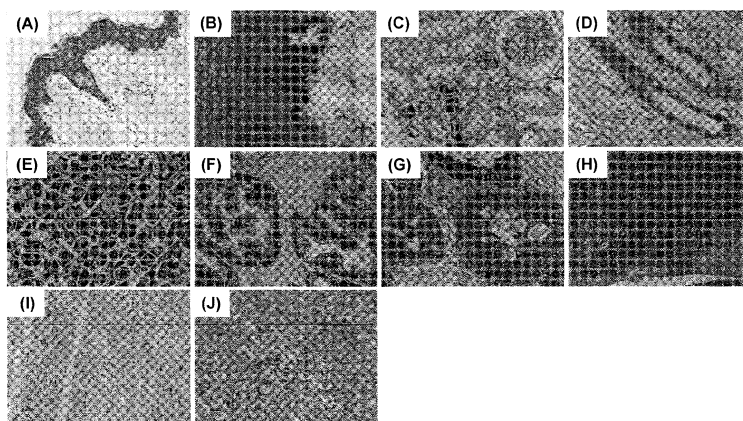
Фиг. 17



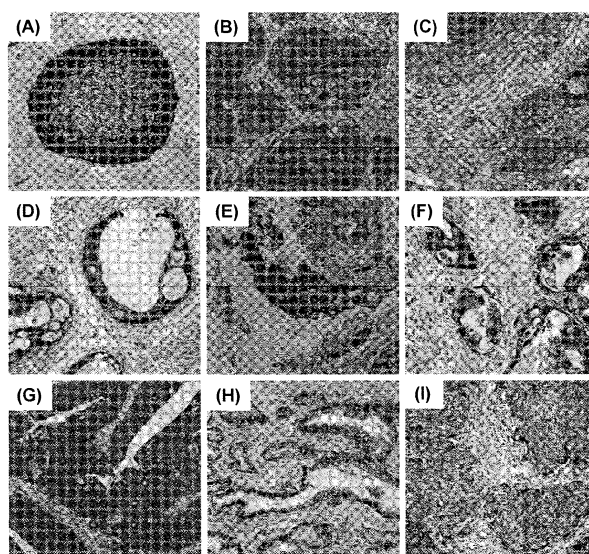
Фиг. 18



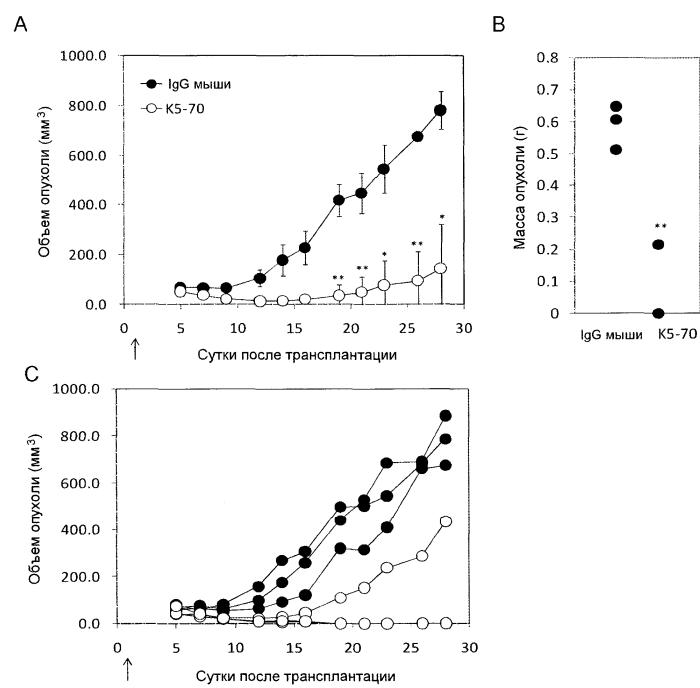
Фиг. 19



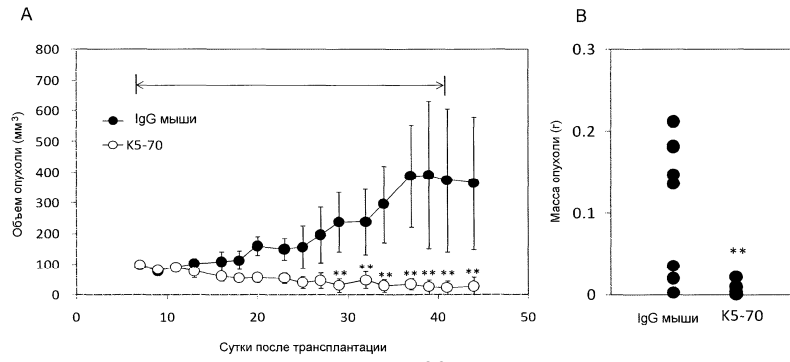
Фиг. 20



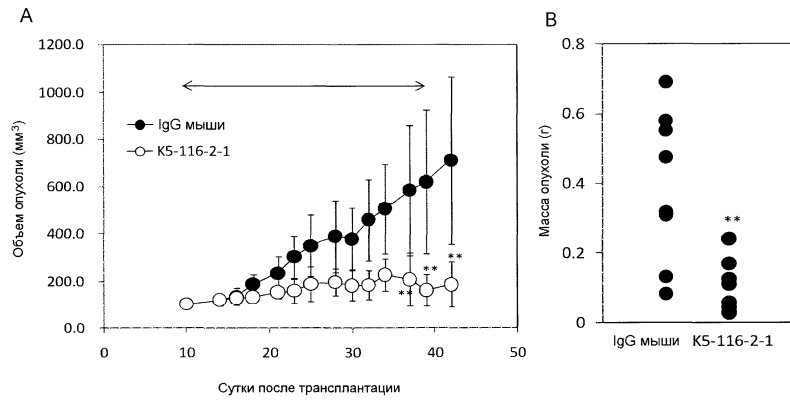
Фиг. 21



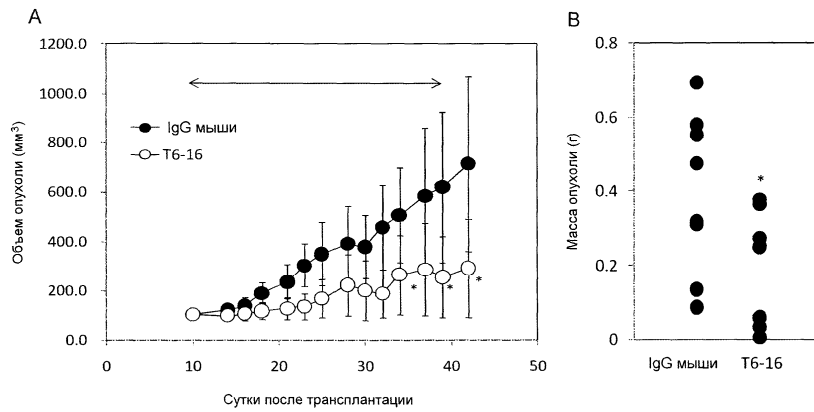
Фиг. 22



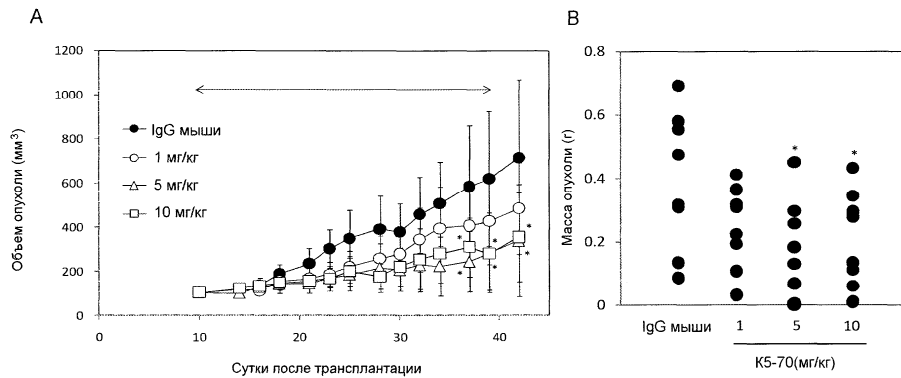
Фиг. 23



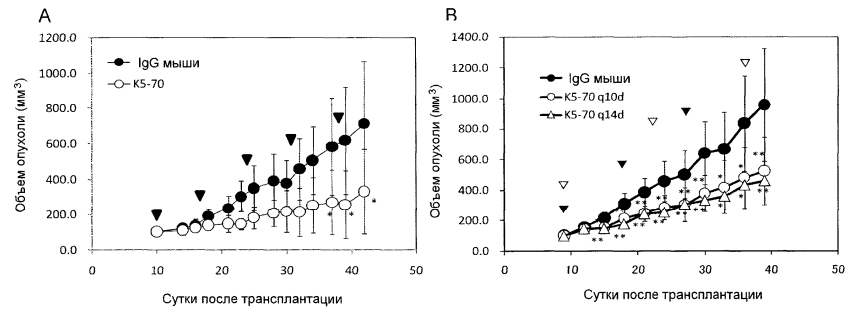
Фиг. 24



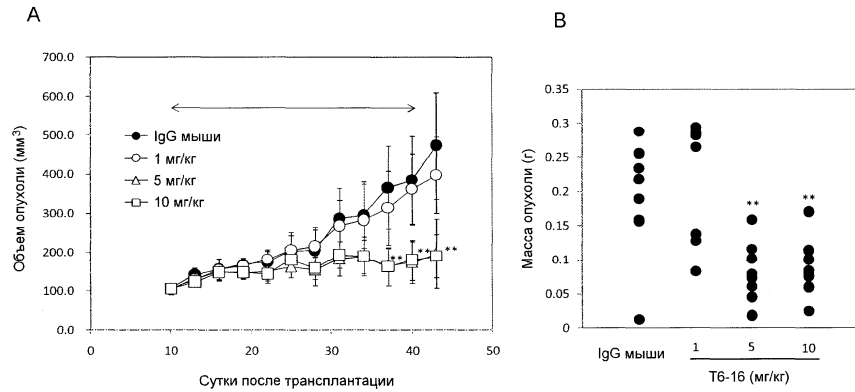
Фиг. 25



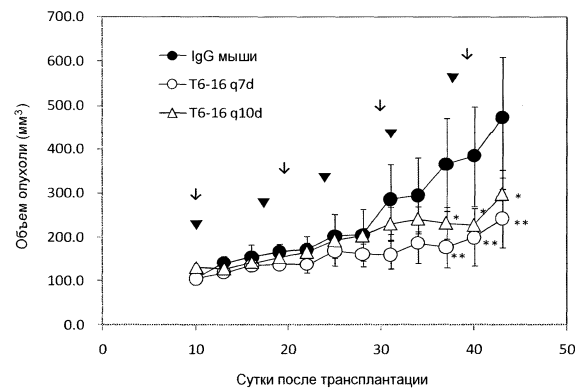
Фиг. 26



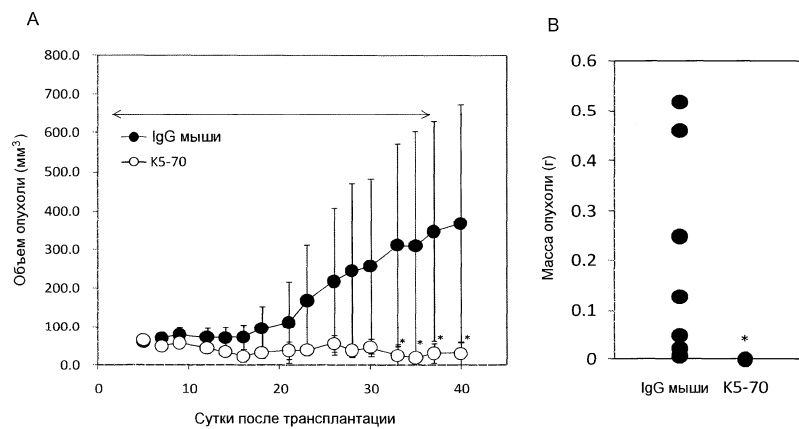
Фиг. 27



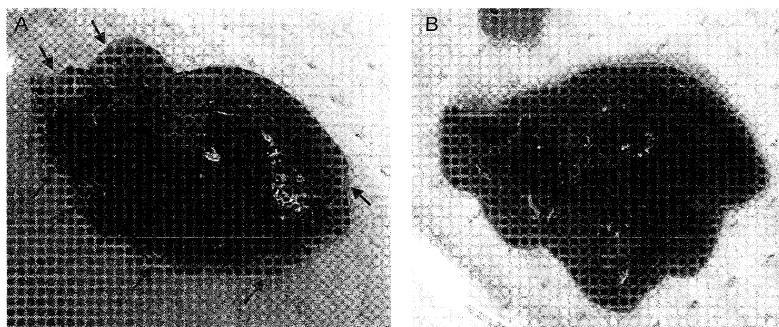
Фиг. 28



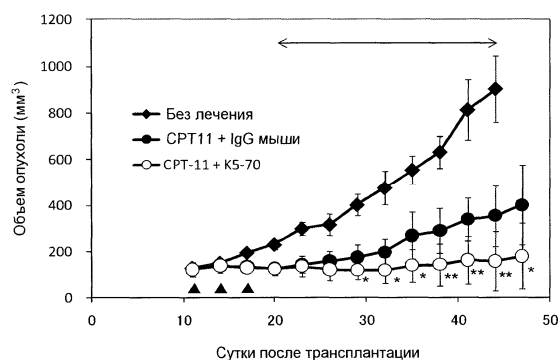
Фиг. 29



Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32

K5-70
VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
GTCCAAGCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGGGCTGGGGCTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCATCTACTGGATAAACTGGGTGAAACAGAGGCCT
C K A S G Y T F T I Y W I N W V K Q R P
GGACAAGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAATACAT
G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N
CAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
Q K F K D K A T L T V D K S S S T A Y M
CAGCTCAGCAGCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAAGCTCTATG
Q L S S P T S E D S A V Y Y C T R T S M
GCGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCA
A D Y W G Q G T T L T V S S

Фиг. 33

K5-70
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGATTTTGTCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCACT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAGCATACTGGTATCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T
AATGGTCTCTCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTACGTTCCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P E T F G S
GGGACAAAGTTGGAATAAAAA
G T K L E I K

Фиг. 34

035852

K5-107
VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
GTCCAAGTGCAGCAACCTGGGTCTGAGCTGGTGAGGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G S E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACATTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCAT
C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R H
GGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTTATCCTGGTGGTGGTTATACTAACTACGAT
G Q G L E W I G N I Y P G G G Y T N Y D
GAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATG
E K F K S K G T L T V D T S S S T A Y M
CACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATCATCCGTT
H L S S L T S E D S A V Y Y C T R S S V
TTTGAAGTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
F D Y W G Q G T T L T V S S

Фиг. 35

K5-107
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTGTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACTGGTTTCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q N I G T S I H W F Q Q R T
AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTACGTTTCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAATAAAA
G T K L E I K

Фиг. 36

K5-116-2-1
VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
GTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCT
C K A S G Y T F T S Y W I T W V K Q R P
GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAAT
G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N
CAAAAGTTCAGGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGTACAGCCTACATG
Q K F R D K A T L T V D K S S S T A Y M
CAGCTCAGCAGCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTACGCCCTCTTTGAC
Q L S S P T S E D S A V Y Y C S A L F D
TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
Y W G Q G T T L T V S S

Фиг. 37

035852

K5-116-2-1
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTCTGCTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAGCATACACTGGTATCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T
AATGGTTCCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTATTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F I L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTCACGTTTCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAATAAAA
G T K L E I K

Фиг. 38

T6-16
VH

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCTCCTGTGAGGAAGTGCAGGCGTCCACTCTGAG
M G W S W I F L F L L S G T A G V H S E
GTCCAGCTTCAGCAGTCAAGACCTGAGCTGGTGAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATTTC
V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S
TGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTACAATATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCAT
C K A S G Y T F T D Y N M H W V K Q S H
GGAAAGAACCTTGAATGGATTGGATATATTATCCTTACAATGGTGGTACTGGCTACAAC
G K N L E W I G Y I Y P Y N G G T G Y N
CAGAGGTTCAAGAGCAGGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
Q R F K S R A T M T V D K S S S T A Y M
GAGCTCCGAGCCTGACATCTGATGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAAGACTAC
E L R S L T S D D S A V Y Y C A R E D Y
GGTAGTAGCCCTCTTATGCTATGGAATTTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCATCGTCTCC
G S S P S Y A M D Y W G Q G T S V I V S
TCA
S

Фиг. 39

T6-16
VL

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGAT
M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D
GTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTGGAGATCAGGCCCTCCATC
V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
TCTTGCAATCTAGTCAGAGCCTTGACACGGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTAC
S C R S S Q S L V H G N G N T Y L H W Y
CTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTCTTCT
L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S
GGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACGGATTTCACTCAAGATCAGC
G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTCTGCTCTCAAATACACATGTTCCACAG
R V E A E D L G V Y F C S Q T T H V P T
TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAA
F G S G T K L E I K

Фиг. 40



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2