

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035947**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.04

(21) Номер заявки
201692042

(22) Дата подачи заявки
2012.11.21

(51) Int. Cl. **C07K 16/30** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

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

(31) **61/562,672**

(32) **2011.11.22**

(33) **US**

(43) **2017.01.30**

(62) **201491006; 2012.11.21**

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

(56) **US-A1-20070202113**
JP-A-2009528995
JP-A-2009527230
JP-A-2006502698
JP-A-2010528056
WO-A1-2010089782
WO-A1-2011145744

(72) Изобретатель:
**Накамура Кодзи, Окамура Кентаро,
Тamura Маки, Янаи Хироюки, Канке
Тору (JP), Цурусита Наоя, Кумар
Шанкар (US)**

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

(57) Изобретение относится к антителу против TROP-2 человека, к фрагменту антитела, способному связываться с TROP-2 человека, к конъюгату антитела-лекарственного средства, к композициям для лечения и диагностики опухоли, которые содержат указанное антитело, к терапевтическому и диагностическому средству, которые содержат указанное антитело, к полинуклеотиду, а также к вектору и клетке.

035947

B1

035947
B1

Область техники, к которой относится изобретение

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 антитело, и к применению указанного антитела.

Уровень техники

TROP-2 человека (Tacstd2, GA733-1 и EGP-1) (далее также называемый "hTROP-2") является белком клеточной мембраны типа 1 с одним трансмембранным доменом, состоящим из 323 аминокислотных остатков (см. SEQ ID NO: 2), и было известно, что такой белок сверхэкспрессируется в разных типах карцином эпидермальных клеток. Присутствие белка клеточной мембраны, связанного с иммунологической резистентностью, который обычно экспрессируется и в трофобластах человека, и в злокачественных клетках, предполагалось давно (непатентный документ 1). Была идентифицирована молекула антигена, распознаваемая моноклональными антителами мыши (162-25.3, 162-46.2), взаимодействующими с белком клеточной мембраны линии клеток хориокарциномы человека BeWo. Такую молекулу антигена считали одной из молекул, экспрессируемых в трофобластах человека, и она была названа Trop-2 (непатентный документ 2). Впоследствии такая же молекула была открыта другими исследователями. Другими словами, опухолевый антиген, распознаваемый моноклональным антителом мыши GA733, которое получено путем иммунизации клетками рака желудка SW948, назван GA733-1 (непатентный документ 3), и эпителиальный гликопротеин, распознаваемый моноклональным антителом мыши RS7-3G11, которое получено иммунизацией клетками немелкоклеточного рака легкого, назван эпителиальным/антигеном карциномы, EGP-1 (непатентный документ 4). В 1995 году клонировали ген Trop-2 и в результате было подтверждено, что такие молекулы представляют собой одинаковые молекулы (непатентный документ 5). Кроме того, было выяснено, что молекула обладает функцией усиления внутриклеточных сигналов кальция в злокачественных клетках (непатентный документ 6), и поэтому ее также называли ассоциированной с опухолью трансдуктор сигнала кальция 2 (TACSTD2).

Ген hTROP-2 картирован в хромосоме 1p32 и составляет семейство генов TACSTD вместе с GA733-2, имеющим с ним гомологию примерно 50% (который был известен как "TACSTD1", "эпителиальный гликопротеин EGP-2", "ErCAM" или "Trop-1") (непатентный документ 7). Белок hTROP-2 (323 аминокислотных остатка; SEQ ID NO: 2) имеет молекулярную массу примерно 36 кДа, и такой белок состоит из гидрофильного сигнального пептида (с 1-й по 26-ю аминокислоту), внеклеточного домена (с 27-й по 274-ю аминокислоту), трансмембранного домена (с 275-й по 297-ю аминокислоту) и внутриклеточного домена (с 298-й по 323-ю аминокислоту). Внеклеточный домен имеет четыре участка гетерогенного N-связанного гликозилирования, и его кажущаяся молекулярная масса возрастает на 11-13 кДа из-за добавления цепей сахара (непатентный документ 5). Считается, что семейство генов TACSTD имеет характерную последовательность тиреоглобулина (TY) во внеклеточном домене и связано с пролиферацией, инвазией и метастазированием злокачественных клеток.

До настоящего времени физиологический лиганд hTROP-2 не был идентифицирован, и его молекулярная функция не была выяснена. Однако было описано, что hTROP-2 передает кальциевый сигнал в опухолевых клетках (непатентный документ 6). Кроме того, на основании таких фактов, что внутриклеточный серин 303 фосфорилируется протеинкиназой C (PKC), которая является Ca^{2+} -зависимой киназой (непатентный документ 4), и что hTROP-2 имеет PIP2-связывающую последовательность в своем внутриклеточном домене, предположили, что hTROP-2 выполняет сигнальную функцию в опухолевых клетках (непатентный документ 8).

В результате анализов, таких как иммуногистохимический (ИHC) и проточно-цитометрический анализы, сообщалось о сверхэкспрессии hTROP-2 во многих типах, происходящих из эпителия карцином, таких как рак желудка, рак легкого, рак прямой и ободочной кишки, рак яичника, рак молочной железы, рак простаты, 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 ниже, чем в злокачественных клетках. Таким образом, предполагается ассоциация TROP-2 с образованием опухолей (патентные документы 1-3 и 9).

Кроме того, было показано, что экспрессия hTROP-2, используемая в качестве биомаркера в клинических образцах, коррелирует со злокачественностью в случае рака прямой и ободочной кишки (непатентные документы 10 и 11), рака поджелудочной железы (непатентный документ 12) или рака полости рта (непатентный документ 13) и что в том случае, когда hTROP-2 сверхэкспрессируется, возможность метастазов или рецидива такой злокачественной опухоли очень высока. Кроме того, в крупномасштабном анализе экспрессии генов с использованием методики, основанной на микроматрицах кДНК, hTROP-2 был идентифицирован в виде генного кластера, который сверхэкспрессируется на наиболее высоком уровне в случае тяжелой папиллярной аденокарциномы яичника, по сравнению с нормальным эпителием яичника (непатентный документ 14).

Кроме того, в последние годы важная роль hTROP-2 в образовании опухолей была показана в моделях с использованием злокачественных клеток ободочной кишки (непатентный документ 15). Так как экспрессия hTROP-2 стимулирует независимую от заякоривания пролиферацию опухолевых клеток и

необходима для образования опухолей и пролиферации злокачественных клеток, подкожно трансплантированных мышам с иммунодефицитом, то появляется вероятность того, что hTROP-2 может действовать как функциональный опухолевый антиген и может быть использован в качестве новой терапевтической мишени.

В настоящее время имеются сообщения об исследованиях, имеющих отношение к противоопухолевым эффектам нескольких анти-hTROP-2-антител. Антитело RS7 (патентный документ 1) было исследовано с применением моделей *in vivo*, в которых использовали меченные радиоактивными веществами антитела, и была показана противоопухолевая активность в моделях ксенотрансплантатов у мышей *nude*. Однако о противоопухолевых эффектах отдельного антитела ("голового" антитела) не сообщалось.

Кроме того, сообщалось о цитотоксичности связанного с цитотоксином моноклонального анти-hTROP-2-антитела BR110 (патентный документ 2) по отношению к линиям злокачественных клеток человека H3619, H2987, MCF-7, H3396 и H2981 в экспериментах *in vitro*. Однако цитотоксичность "голового" антитела или иммуноконъюгата BR110 *in vivo* не была описана.

В последние годы сообщалось, что изолированные моноклональные антитела, которые были получены из линии клеток гибридомы AR47A6.4.2 или AR52A301.5, полученных в результате иммунизации мышей тканями злокачественных опухолей яичника человека, связываются с hTROP-2 и что, во-первых, они проявляют в виде "голового" антитела противоопухолевую активность в моделях на основе ксенотрансплантатов у мышей *nude*, а также цитотоксичность *in vitro* (патентные документы 3 и 4). В указанных патентных документах указанное выше антитело проявляло противоопухолевые эффекты при обработке только антителом в моделях ксенотрансплантатов у мышей, которым трансплантировали линии злокачественных клеток поджелудочной железы VxPC-3 и PL45, линию злокачественных клеток простаты PC-3, линию злокачественных клеток молочной железы MCF-7 и линию злокачественных клеток ободочной кишки Co1o205. Терапевтические эффекты антитела проявлялись в моделях, в которых были трансплантированы клетки VxPC-3. Помимо этого образование опухолей и пролиферация были только частично (примерно от 40 до 60%) подавлены в результате профилактического введения антитела, и было необходимо чрезвычайно большое количество (примерно 20 мг/кг) антитела для такого подавления образования опухоли и пролиферации.

На основании описанных выше предыдущих данных было высказано предположение о возможном применении анти-hTROP-2-антитела в качестве противоопухолевого антитела. Однако не все анти-hTROP-2-антитела проявляют противоопухолевые эффекты при лечении только антителом в виде "голового" антитела *in vivo*. Антитела оказывают разное действие на hTROP-2, в зависимости от участка связывания, аффинности и свойств 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), p. 1947-1951 (1978).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Сущность изобретение

В настоящем документе описано антитело против TROP-2 человека, в котором V-область H-цепи антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92 или 98 и V-область L-цепи антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93. Также описан вариант указанного антитела, в котором аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области H-цепи антитела представляют собой SEQ ID NO: 36-38 соответственно и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи антитела представляют собой SEQ ID NO: 41-43 соответственно. Указанные антитела могут быть гуманизированными. Антитела, описанные в настоящем документе, обладают противоопухолевой активностью *in vivo* и могут проявлять 50% или большую ингибиторную активность в отношении роста опухоли при дозе 5-20 мг/кг массы тела, 10 мг/кг массы тела. Константа диссоциации (значение K_d) указанных антител равна $1,0 \times 10^{-10}$ М или меньше. Описанные антитела могут быть моноклональными

антителами.

Опухоль, в отношении которой можно использовать заявленное антитело, представляет собой по меньшей мере один тип, выбранный из группы, включающей рак поджелудочной железы человека, рак предстательной железы человека, рак прямой кишки человека, рак молочной железы человека, рак яичника человека, рак легкого человека и рак желчного протока человека. Тип опухоли представляет собой по меньшей мере один тип, выбранный из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака толстой кишки человека, рака легкого человека, рака молочной железы человека и рака яичников человека. Опухоль может быть рецидивирующей злокачественной опухолью или метастатической злокачественной опухолью. Линия опухолевых клеток относится по меньшей мере к двум типам, выбранным из группы, состоящей из линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-59, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека ВхРС-3, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека КР-3L, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека КР-2, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-1, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-45Н, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-45Р, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека ТСС-PAN2, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека SUIT-2, линии клеток злокачественной опухоли простаты человека САСО-2, линии клеток злокачественной опухоли простаты человека SW480, линии клеток злокачественной опухоли простаты человека DLD-1, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека НСТ 116, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека JIMT-1, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека НСС1143, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MCF-7, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468, линии клеток злокачественной опухоли простаты человека DU145, линии клеток злокачественной опухоли простаты человека РС-3, линии клеток злокачественной опухоли яичника человека SK-OV-3, линии клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3 и линии клеток злокачественной опухоли желчных протоков человека TFK-1.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фрагменту антитела, способному связываться с TROP-2 человека, полученному из указанных антител.

Описан конъюгат антитело-лекарственное средство, который содержит указанное антитело, а также вещество, обладающее противоопухолевой активностью и/или которое способно уничтожать клетки.

Кроме того, в описании раскрыта композиция для лечения опухоли, которая содержит по меньшей мере одно из указанных вариантов антитела, фрагмент указанных антител или указанный конъюгат, а также фармацевтически приемлемый носитель. Указанная композиция не вызывает снижение массы как побочный эффект.

Настоящее изобретение относится к композиции для диагностики опухоли, которая содержит по меньшей мере одно из указанных выше антител, фрагмент указанных антител или указанный конъюгат, а также реагент для проведения детекции опухоли.

Кроме того, описано терапевтическое противоопухолевое средство, которое содержит по меньшей мере одно из указанных выше антител, фрагмент указанных антител или указанный конъюгат. Такое средство не вызывает снижение массы как побочный эффект.

Кроме того, описаны полинуклеотиды, кодирующие указанные антитела, рекомбинантный вектор, содержащий такой полинуклеотид, а также трансформированная клетка, содержащая этот рекомбинантный вектор.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показано измерение аффинности связывания антигена (K_d : константа диссоциации) моноклонального анти-hTROP-2-антитела (K5-70). $A_{T_{сум}}$: антитело (суммарное); $A_{T_{св}}$: антиген (свободный).

На фиг. 2 показана реактивность надосадка культуры гибридомы, продуцирующей моноклональное анти-hTROP-2-антитело, по отношению к клеткам NuH-7 (hTROP-2-негативные) и клеткам NuH-7-hTROP-2. Заштрихованная гистограмма показывает клетки NuH-7, и незаштрихованная гистограмма показывает клетки NuH-7-hTROP-2.

На фиг. 3 показана реактивность моноклонального анти-hTROP-2-антитела по отношению к линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (клетки РК-59), которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности. Заштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии только со вторым антителом (PE-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии с каждым моноклональным анти-hTROP-2-антителом.

На фиг. 4 показана реактивность моноклонального анти-hTROP-2-антитела по отношению к линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (клетки ВхРС-3), которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности. Заштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии только со вторым антителом (PE-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии с каждым моноклональным анти-hTROP-2-антителом.

На фиг. 5 показана реактивность моноклонального анти-hTROP-2-антитела (K5-70) по отношению к линиям клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека. Заштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии только со вторым антителом (PE-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии с каждым моноклональным анти-hTROP-2-антителом.

На фиг. 6 показана реактивность моноклонального анти-hTROP-2-антитела (K5-70) по отношению к линиям клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека (Colo320, CACO2, SW480, DLD1, CW2 и HCT 116), линиям клеток злокачественной опухоли молочной железы человека (JMT-1 и HCC1143) и линиям клеток злокачественной опухоли простаты человека (PC-3 и DU145). Заштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии только со вторым антителом (PE-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии с моноклональным анти-hTROP-2-антителом.

На фиг. 7 показана перекрестная реактивность моноклональных анти-hTROP-2-антител с TROP-2 мыши. Использовали клетки, полученные благодаря обеспечению возможности временной экспрессии гена TROP-2 мыши в клетках CHO-K1, и антитело T2-102 (IgG1 мыши), проявляющие перекрестную реактивность с TROP-2 мыши, использовали в качестве позитивного контрольного антитела. Заштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеток только со вторым антителом (PE-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеток с каждым моноклональным анти-hTROP-2-антителом.

На фиг. 8 показана перекрестная реактивность моноклональных анти-hTROP-2-антител по отношению к EpCAM/TROP-1 человека. Использовали клетки, полученные благодаря обеспечению возможности временной экспрессии гена EpCAM/TROP-1 человека в клетках CHO-K1, и PE-меченое моноклональное антитело против EpCAM человека (Becton, Dickinson and Company) использовали в качестве позитивного контрольного антитела. Заштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеток только со вторым антителом (PE-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеток с каждым моноклональным анти-hTROP-2-антителом.

На фиг. 9 показана ингибирующая рост клеток активность анти-hTROP-2-антител (T6-16, T5-86, K5-70 и K5-107) в отношении линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (клетки PK-59). mIgG означает контрольное антитело (IgG мыши), и YY01 означает коммерчески доступное анти-hTROP-2-антитело (Santa Cruz). Белая колонка: 0 мкг/мл; серая колонка: 0,1 мкг/мл; черная колонка: 1 мкг/мл. Уровень активности выражали в виде отношения реального значения к значению, получаемому, когда антитело не было добавлено (0 мкг/мл). Столбик ошибки показывает стандартное отклонение. *P<0,05, **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 10 показан анализ способом исследования зарастания царапины линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (клетки PK-59) в присутствии анти-hTROP-2-антител (T6-16 и K5-70).

А: показаны типичные примеры фотографий области царапины в клетках PK-59. День 0 относится к типичному примеру ситуации сразу после нанесения царапины. Обозначением mIgG (день 1) показана фотография, сделанная через 1 день (24 ч) после нанесения царапины и затем добавления контрольного антитела (IgG мыши, 1 мкг/мл) в среду. Обозначением K5-70 (день 1) показана фотография, сделанная через 1 день (24 ч) после нанесения царапины и затем добавления антитела K5-70 (1 мкг/мл) в среду. Обозначением T6-16 (день 1) показана фотография, сделанная через 1 день (24 ч) после нанесения царапины и затем добавления антитела T6-16 (1 мкг/мл) в среду. Каждая стрелка на каждой фотографии указывает ширину области царапины.

В: область нанесения царапины анализировали, используя компьютерную программу для анализа изображений (Scion Image), и на основании полученного значения вычисляли значение для каждого тестируемого антитела с использованием значения, полученного в 0 день для группы с добавлением контрольного антитела (mIgG) в качестве стандартного значения, равного 1.

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

На фиг. 11 представлено изображение, иллюстрирующее FACS-анализ, показывающий экспрессию маркера стволовых клеток в линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59.

А: представлено изображение, иллюстрирующее FACS-анализ, показывающий экспрессию EpCAM в клетках PK-59. Заштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеток только со вторым антителом (PE-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеток с антителом против EpCAM человека (Becton, Dickinson and Company).

В и С: представлены изображения, иллюстрирующие FACS-анализ, показывающий экспрессию Р-гликопротеина/MCR1 человека в клетках PK-59 (фиг. 11В) и экспрессию ABCG2 в клетках PK-59 (фиг. 11С). Синяя гистограмма показывает взаимодействие клеток только со вторым антителом, и красная гистограмма показывает взаимодействие клеток с антителом против Р-гликопротеин/MDR1 человека (BD Biosciences Pharmingen) (фиг. 11В) или с антителом против ABCG2 человека (BD Biosciences Pharmingen) (фиг. 11С).

D: показан FACS-анализ, в котором клетки РК-59 дважды красили маркерами стволовых клеток рака поджелудочной железы, ФИТЦ-меченым антителом против CD24 человека (BD Biosciences Pharmingen) и PE-меченым антителом против CD44 человека (BD Biosciences Pharmingen). Каждое число на фиг. 11D показывает существующую долю клеток в каждой фракции.

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

A: показан временной ход роста опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка указывает период введения антитела. *P<0,05, **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

B: показана нанесенная на графике масса опухолей каждой мыши на 21-й день (день 21) (последний день эксперимента) проведения теста, показанного на фиг. 12A. Числовое значение на каждом графике показывает среднее значение ± стандартное отклонение. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 13 показана оценка противоопухолевой активности клона K5-107 (A), клона T6-16 (B) и клона K5-116-2-1 (C) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток РК-59. Символ "●" показывает контрольную группу (IgG мыши), и символ "○" показывает группу введения анти-hTROP-2-антитела (10 мг/кг массы тела). Стрелка на графике показывает период введения антитела, и числовое значение на каждом графике показывает среднее значение ± стандартное отклонение. *P<0,05 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 14 показана оценка противоопухолевой активности клона K5-70 (A), клона T6-16 (B) и клона K5-116-2-1 (C) в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием клеток РК-59. Символ "●" показывает контрольную группу (IgG мыши), и символ "○" показывает группу введения анти-hTROP-2-антитела (10 мг/кг массы тела). Стрелка на графике показывает период введения антитела, и числовое значение на каждом графике показывает среднее значение ± стандартное отклонение. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 15 показана оценка противоопухолевой активности клона K5-70 в моделях профилактики и лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток VxPC-3.

A: показан временной ход роста опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) в моделях профилактики (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

B: показан временной ход роста опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) в моделях лечения (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. *P<0,05 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 16 показана зависимость от дозы противоопухолевая активность клона K5-70 в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием клеток РК-59. Объем опухоли выражен в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

A: показан временной ход роста опухолей в контрольной группе (□: IgG мыши) и в группах введения антитела K5-70 (□: 1 мг/кг массы тела, Δ: 5 мг/кг массы тела) в разных дозах (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. *P<0,05 (t-критерий Стьюдента), **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

B: показана нанесенная на графике масса опухолей каждой мыши во временной точке 17-й день (день 17) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фиг. 16A. Числовое значение на каждом графике показывает среднее значение ± стандартное отклонение. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

Фиг. 17 представляет собой схематичное изображение химерного белка TROP-2 человека/мыши, используемого в эксперименте. SP: сигнальная последовательность; домен TY: область тиреоглобулина типа 1; TM: трансмембранная область; C: внутриклеточная область, при этом заштрихованная область представляет полипептид, полученный из hTROP-2, тогда как незаштрихованная область представляет полипептид, полученный из TROP-2 мыши. Число, указанное на схематичном изображении химерного белка сверху, показывает количество аминокислот белка TROP-2 мыши, и число, указанное снизу, показывает количество аминокислот белка hTROP-2.

На фиг. 18 показаны результаты, полученные при идентификации области связывания моноклонального анти-hTROP-2-антитела с использованием химерного TROP-2 человека/мыши. С использованием клеток НЕК293, которые постоянно экспрессируют либо химерный белок TROP-2-C человека/мыши (hmTROP-2-C), либо химерный белок TROP-2-D мыши/человека (mhTROP-2-D), исследовали реактивность моноклональных анти-hTROP-2-антител, показанных на фигуре. В качестве негативного контроля использовали IgG2b мыши.

На фиг. 19 показаны результаты, полученные при идентификации области связывания антитела моноклонального анти-hTROP-2-антитела. Ген hTROP-2 и каждый ген химерного TROP-2 человека/мыши вводили в клетки НЕК293 и затем осуществляли FACS-анализ, используя клетки, в которых гены были временно экспрессированы.

(А): показано исследование реактивности антител K5-70, K5-107, T5-86 и K5-116-2-1 по отношению к hTROP-2 (верхний ряд), по отношению к hmTROP-2-A (средний ряд) и по отношению к hmTROP-2-B (нижний ряд). В качестве негативного контроля использовали IgG2b мыши.

(В): показано исследование реактивности антител T6-4 и T6-16 по отношению к hTROP-2 (верхний ряд), по отношению к mhTROP-2-E (средний ряд) и по отношению к mhTROP-2-F (нижний ряд). В качестве негативного контроля использовали IgG2b мыши.

На фиг. 20 показана экспрессия hTROP-2 в нормальных тканях человека. Матрицы нормальных тканей человека иммунологически красили, используя моноклональное анти-hTROP-2-антитело клона K5-63-17. (А) кожа, (В) пищевод, (С) почка (корковое вещество), (D) почка (мозговое вещество), (Е) поджелудочная железа, (F) простата, (G) мочевого пузыря, (H) миндалина, (I) сердце, (J) печень (увеличение: $\times 200$)

На фиг. 21 показана экспрессия hTROP-2 в тканях злокачественных опухолей. Матрицы злокачественных тканей человека иммунологически красили, используя моноклональное анти-hTROP-2-антитело клона K5-63-17. (А) рак молочной железы, (В) рак легкого, (С) рак пищевода, (D) рак желудка, (Е) рак поджелудочной железы, (F) рак прямой и ободочной кишки, (G) рак мочевого пузыря, (H) рак простаты, (I) рак яичника (увеличение: $\times 100$)

На фиг. 22 показана противоопухолевая активность клона K5-70 при однократном введении в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием клеток PK-59.

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○), (среднее значение \pm стандартное отклонение). Стрелкой показано введение антитела. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента), ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на графике масса опухолей каждой мыши во временной точке 28-й день (день 28) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фиг. 22А. ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

С: показан временной ход образования опухолей у каждой мыши в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○). Стрелкой указано введение антитела.

На фиг. 23 показана противоопухолевая активность клона K5-70 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием злокачественных клеток ободочной кишки человека SW480.

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение \pm стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на графике масса опухолей для каждой мыши во временной точке 44-й день (день 44) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фиг. 23А. ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

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

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-116-2-1 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение \pm стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на графике масса опухолей для каждой мыши во временной точке 42-й день (день 42) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фиг. 24А. ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

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

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела T6-16 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение \pm стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на графике масса опухолей для каждой мыши во временной точке 42-й день (день 42) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фиг. 25А. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 26 показана зависимость от дозы противоопухолевая активность клона K5-70 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток SW480.

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (○: 1 мг/кг массы тела, Δ : 5 мг/кг массы тела, \square : 10 мг/кг массы тела) (среднее значение \pm стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на графике масса опухолей для каждой мыши во временной точке 42-й день (день 42) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фиг. 26А. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

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

А: показана противоопухолевая активность антитела K5-70 при введении с интервалами в одну неделю. Показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○: 10 мг/кг) (среднее значение ± стандартное отклонение). Головки стрелок (дни 10, 17, 24, 31 и 38) указывают введение антитела K5-70. *P<0,05, t-критерий Стьюдента.

В: представляет собой изображение, показывающее противоопухолевую активность антитела K5-70 при введении с интервалами один раз каждые десять дней (q10d) или один раз каждые две недели (q14d). На фигуре показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши, 10 мг/кг) и в группе введения антитела K5-70 (○: q10d, 10 мг/кг, Δ: q14d, 10 мг/кг) (среднее значение ± стандартное отклонение). Заштрихованными головками стрелок (▼: дни 9, 19 и 29) и незаштрихованными головками стрелок (∇: дни 9, 23 и 37) указано введение антитела K5-70. *P<0,05, **P<0,01, t-критерий Стьюдента.

На фиг. 28 показана зависимость от дозы противоопухолевая активность клона T6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток SW480.

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела T6-16 (○: 1 мг/кг массы тела, Δ: 5 мг/кг массы тела, □: 10 мг/кг массы тела) (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 43-й день (день 43) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фиг. 28А. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 29 показана противоопухолевая активность клона T6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток SW480. Показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши, 10 мг/кг массы тела) и в группе введения антитела T6-16 (10 мг/кг массы тела) (○: q7d, Δ: q10d) (среднее значение ± стандартное отклонение). Головки стрелок (дни 10, 17, 24, 31 и 38) и стрелки (дни 10, 20, 30 и 40) показывают введение антитела T6-16. Введение осуществляли один раз каждые три дня в контрольной группе. *P<0,05, **P<0,01, t-критерий Стьюдента.

На фиг. 30 показана противоопухолевая активность клона K5-70 в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием клеток простаты человека DU-145.

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. *P<0,05 (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 40-й день (день 40) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фиг. 30А. *P<0,05 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 31 показана ингибирующая метастазы активность клона K5-70 в модели метастазов в печени с использованием клеток РК-59.

А и В: показана фотография вырезанной печени в контрольной группе (●: IgG мыши) (А) и группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (В), которые были сделаны через 6 недель после трансплантации клеток. Стрелками показаны очаги метастазов в печени.

На фиг. 32 показана противоопухолевая активность K5-70 в моделях ксенотрансплантатов с использованием клеток SW480, которые являются моделями рецидивирующих злокачественных опухолей, после введения гидрохлорида иринотекана. На данной фигуре показан временной ход образования опухолей в группе без обработки (◆), в группе введения гидрохлорида иринотекана (40 мг/кг массы тела) + антитело K5-70 (○: 10 мг/кг массы тела) и в группе введения гидрохлорида иринотекана (40 мг/кг массы тела) + IgG мыши (●: 10 мг/кг массы тела) (среднее значение ± стандартное отклонение). Головки стрелок (дни 11, 14, и 17) показывают введение гидрохлорида иринотекана. Антитело K-70 или IgG мыши вводили один раз каждые три дня, начиная с 20 дня. Стрелка показывает период введения антитела. *P<0,05, **P<0,01, t-критерий Стьюдента.

На фиг. 33 показана нуклеотидная последовательность κДНК варибельной области Н-цепи клона K5-70 (VH) (SEQ ID NO: 34) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 35). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутый двумя чертами глутамин (Q) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *IYWIN*, *NIYPSDSYTNYNQKFKD* и *TSMADY*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (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 K5-70 показаны в SEQ ID NO: 36-38 соответственно.

На фиг. 34 показана нуклеотидная последовательность κДНК варибельной области L-цепи клона K5-70 (VL) (SEQ ID NO: 39) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 40). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутая двумя чертами аспарагиновая кислота (D) соответст-

вует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *RASQSIGTSH*, *YASESIS* и *QQNSWPFT*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона K5-70 показаны в SEQ ID NO: 41-43 соответственно.

На фиг. 35 показана нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области H-цепи клона K5-107 (VH) (SEQ ID NO: 44) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 45). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутый двумя чертами глутамин (Q) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *SYWMH*, *NIYPGGGYTNYDEKFKS* и *SSVFDY*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VH клона K5-107 показаны в SEQ ID NO: 46-48, соответственно.

На фиг. 36 показана нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области L-цепи клона K5-107 (VL) (SEQ ID NO: 49) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 50). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутая двумя чертами аспарагиновая кислота (D) показывает N-концевую аминокислотную остаток зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *RASQSIGTSH*, *YASESIS* и *QQNSWPFT*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона K5-107 показаны в SEQ ID NO: 51-53, соответственно.

На фиг. 37 показана нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области H-цепи клона K5-116-2-1 (VH) (SEQ ID NO: 54) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 55). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутый двумя чертами глутамин (Q) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *SYWIT*, *NIYPSDSYTNYNQKFRD* и *LFDY*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VH клона K5-116-2-1 показаны в SEQ ID NO: 56-58 соответственно.

На фиг. 38 показана нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области L-цепи клона K5-116-2-1 (VL) (SEQ ID NO: 59) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 60). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутая двумя чертами аспарагиновая кислота (D) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *RASQSIGTSH*, *YASESIS*, и *QQNSWPFT*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона K5-116-2-1 показаны в SEQ ID NO: 61-63 соответственно.

На фиг. 39 показана нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области H-цепи клона T6-16 (VH) (SEQ ID NO: 64) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 65). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутая двумя чертами глутаминовая кислота (E) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *DYNMH*, *YIYPYNGGTGYNQRFKS* и *EDYGSSPSYAMDY*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VH клона T6-16 показаны в SEQ ID NO: 66-68 соответственно.

На фиг. 40 показана нуклеотидная последовательность кДНК варибельной области L-цепи клона T6-16 (VL) (SEQ ID NO: 69) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 70). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутая двумя чертами аспарагиновая кислота (D) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *RSSQSLVHGNNTYLH*, *KVSNRFS* и *SQTTHVPT*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона T6-16 показаны в SEQ ID NO: 71-73 соответственно.

На фиг. 41 показано выравнивание аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 35) варибельной области H-цепи клона K5-70 (K5-70 VH), аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 75) варибельной области H-цепи гуманизированного K5-70 (HuK5-70 VH) и аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 85) варибельной области H-цепи акцептора (номер доступа в Genbank DA980102; SEQ ID NO: 84), используемого для получения гуманизированного антитела (DA980102 VH). (Следует отметить, что каждая из аминокислотных последовательностей, показанных на фигуре, соответствует части аминокислотной последовательности каждой варибельной области H-цепи (в частности, аминокислотной последовательности части зрелого белка, из которой удален сигнальный пептид)).

Аминокислотная последовательность, подчеркнутая в K5-70 VH, соответствует последовательности CDR, определенной согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Кроме того, число над аминокислотной последовательностью указывает номер положения аминокислоты, определенный согласно указанным выше определениям Кабата и соавторов. Каждая последовательность CDR в DA980102 VH указана символом "---", и при этом описание пропущено. Так как полагают, что аминокислота, подчеркнутая в HuK5-70 VH, важна для поддержания структуры CDR, последовательность K5-70 VH сохраняли. Кроме того, что касается аминокислоты,

подчеркнутой двойной чертой в HuK5-70 VH, то аминокислота соответствующей области DA980102 VH (метионин (M)) редко встречается в данном положении. Поэтому в целях снижения антигенности аминокислоту, подчеркнутую двойной чертой в HuK5-70 VH, заменяли лейцином (L), как типичной аминокислотой, относящейся к той же подгруппе.

На фиг. 42 показано выравнивание аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 40) вариабельной области L-цепи клона K5-70 (K5-70 VL), аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 77) вариабельной области L-цепи гуманизированного K5-70 (HuK5-70 VL) и аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 87; номер доступа в Genbank AAA64877) вариабельной области L-цепи акцептора (номер доступа в Genbank L41174; SEQ ID NO: 86), используемого для получения гуманизированного антитела (L41174 VL). (Следует отметить, что каждая из аминокислотных последовательностей, показанных на фигуре, соответствует части аминокислотной последовательности каждой вариабельной области L-цепи (в частности, аминокислотной последовательности части зрелого белка, из которой удален сигнальный пептид)).

Аминокислотная последовательность, подчеркнутая в K5-70 VL, соответствует последовательности CDR, определенной согласно определениям Кабата и соавторов (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Кроме того, числа над аминокислотной последовательностью указывают номер положения аминокислоты, определенный согласно определениям Кабата и соавторов. Каждая последовательность CDR в L41174 VL указана символом "---", и при этом описание пропущено. Так как полагают, что аминокислота, подчеркнутая в HuK5-70 VL важна для поддержания структуры CDR, последовательность K5-70 VL сохраняли.

На фиг. 43 показано выравнивание аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 65) вариабельной области H-цепи клона T6-16 (T6-16 VH), аминокислотных последовательностей (SEQ ID NO: 79 и 81 соответственно) вариабельных областей H-цепи двух типов гуманизированного антитела T6-16 (HuT6-16 VH1 и HuT6-16 VH2) и аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 89) вариабельной области H-цепи акцептора (номер доступа в Genbank DA935238; SEQ ID NO: 88), используемого для получения гуманизированного антитела (DA935238 VH). (Следует отметить, что каждая из аминокислотных последовательностей, показанных на фигуре, соответствует части аминокислотной последовательности каждой вариабельной области H-цепи (в частности, аминокислотной последовательности части зрелого белка, из которой удален сигнальный пептид)).

Аминокислотная последовательность, подчеркнутая в HuT6-16 VH, соответствует последовательности CDR, определенной согласно определениям Кабата и соавторов (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Кроме того, число над аминокислотной последовательностью указывает номер положения аминокислоты, определенный согласно вышеуказанным определениям Кабата и соавторов. Каждая последовательность CDR в DA935238 VH указана символом "---", и при этом описание пропущено. Так как полагают, что аминокислоты, подчеркнуты в HuT6-16 VH1 и HuT6-16 VH2, важны для поддержания структуры CDR, последовательность T6-16 VH сохраняли. Кроме того, лизин (K) в положении 73 в HuT6-16 VH1 заменяли треонином (T), полученным из DA935238 в качестве акцепторной последовательности в HuT6-16 VH2.

На фиг. 44 показано выравнивание аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 70) вариабельной области L-цепи клона T6-16 (T6-16 VL), аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 83) вариабельной области L-цепи гуманизированного T6-16 (HuT6-16 VL) и аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 91; номер доступа в Genbank AAA60341) вариабельной области L-цепи акцептора (номер доступа в Genbank M99608; SEQ ID NO: 90), используемого для получения гуманизированного антитела (M99608 VL). (Следует отметить, что каждая из аминокислотных последовательностей, показанных на фигуре, соответствует части аминокислотной последовательности каждой вариабельной области L-цепи (в частности, аминокислотной последовательности части зрелого белка, из которой удален сигнальный пептид)).

Аминокислотная последовательность, подчеркнутая в T6-16 VL, соответствует последовательности CDR, определенной согласно определениям Кабата и соавторов (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Кроме того, число над аминокислотной последовательностью указывает номер положения аминокислоты, определенный согласно вышеуказанным определениям Кабата и соавторов. Каждая последовательность CDR в M99608 VL указана символом "---", и при этом описание пропущено.

На фиг. 45 показана последовательность гена (SEQ ID NO: 74) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 75) HuK5-70 VH.

В верхнем ряду каждой линии показана последовательность гена (последовательность кДНК) и в нижнем ряду показана аминокислотная последовательность. В аминокислотной последовательности часть, представленная сигнальным пептидом, подчеркнута пунктирной линией, и каждая последовательность CDR (CDR 1-3) подчеркнута сплошной линией (аминокислотная последовательность только части зрелого белка, из которой удалена часть сигнального пептида, показана в SEQ ID NO: 92). Сайт EcoRI (GAA TTC) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу гена HuK5-70 VH и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к его 3'-концу.

На фиг. 46 показана последовательность гена (SEQ ID NO: 76) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 77) HuK5-70 VL.

В верхнем ряду каждой линии показана последовательность гена (последовательность кДНК) и в нижнем ряду показана аминокислотная последовательность. В аминокислотной последовательности часть, представленная сигнальным пептидом, подчеркнута пунктирной линией и каждая последовательность CDR (CDR 1-3) подчеркнута сплошной линией (аминокислотная последовательность только части зрелого белка, из которого удалена часть сигнального пептида, показана в SEQ ID NO: 93). Сайт AgeI (ACC GGT) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу гена HuK5-70 VL и сайт BsiWI (CGT ACG) добавляли к его 3'-концу.

На фиг. 47 показана последовательность гена (SEQ ID NO: 78) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 79) HuT6-16 VH1.

В верхнем ряду каждой линии показана последовательность гена (последовательность кДНК) и в нижнем ряду показана аминокислотная последовательность. В аминокислотной последовательности часть, представленная сигнальным пептидом, подчеркнута пунктирной линией и каждая последовательность CDR (CDR 1-3) подчеркнута сплошной линией (аминокислотная последовательность только части зрелого белка, из которого удален сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO: 94). Сайт EcoRI (GAA TTC) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу гена HuT6-16 VH1 и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к его 3'-концу.

На фиг. 48 показана последовательность гена (SEQ ID NO: 80) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 81) HuT6-16 VH2.

В верхнем ряду каждой линии показана последовательность гена (последовательность кДНК) и в нижнем ряду показана аминокислотная последовательность. В аминокислотной последовательности часть, представленная сигнальным пептидом, подчеркнута пунктирной линией и каждая последовательность CDR (CDR 1-3) подчеркнута сплошной линией (аминокислотная последовательность только части зрелого белка, из которого удален сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO: 95). Сайт EcoRI (GAA TTC) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу гена HuT6-16 VH2 и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к его 3'-концу.

На фиг. 49 показана последовательность гена (SEQ ID NO: 82) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 83) HuT6-16 VL.

В верхнем ряду каждой линии показана последовательность гена (последовательность кДНК) и в нижнем ряду показана аминокислотная последовательность. В аминокислотной последовательности часть, представленная сигнальным пептидом, подчеркнута пунктирной линией и каждая последовательность CDR (CDR 1-3) подчеркнута сплошной линией (аминокислотная последовательность только части зрелого белка, из которого удален сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO: 96). Сайт AgeI (ACC GGT) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу гена HuT6-16 VL и сайт BsiWI (CGT ACG) добавляли к его 3'-концу.

На фиг. 50 показаны результаты, полученные при подтверждении экспрессии антитела HuK5-70, антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2.

(A): Векторы экспрессии pFUSE-CHIg-HuK5-70 и pFUSE2-CLIg-HuK5-70 вводили в клетки 293F и анализировали экспрессию антитела HuK5-70 в надсадке культуры, используя Вестерн-блоттинг. На дорожке 1 показан надсадок культуры клеток 293F, в которые не были введены гены (негативный контроль), и на дорожке 2 показан надсадок культуры клеток 293F, в которые были введены вышеуказанные векторы экспрессии. Белки тяжелой цепи и легкой цепи антитела HuK5-70 выявляли с использованием меченого биотином антитела против F(ab')₂ IgG человека.

B: Векторы экспрессии pFUSE-CHIg-HuT6-16-1 и pFUSE2-CLIg-HuT6-16 (дорожка 3) и векторы экспрессии pFUSE-CHIg-HuT6-16-2 и pFUSE2-CLIg-HuT6-16 (дорожка 4) вводили в клетки 293F в таких сочетаниях. Затем анализировали экспрессию антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2, используя Вестерн-блоттинг. Белки тяжелой цепи антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 выявляли с использованием меченого биотином антитела против Fc IgG человека, и белки легкой цепи антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 выявляли с использованием меченого биотином антитела против F(ab')₂ IgG человека.

На фиг. 51 показаны результаты, полученные при окрашивании очищенного антитела HuK5-70, антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 красителем Кумасси.

Очищенное антитело HuK5-70 (дорожка 1), антитело HuT6-16-1 (дорожка 2) и антитело HuT6-16-2 (дорожка 3) загружали в количестве 1 мкг каждого на SDS-ПААГ и затем красили Кумасси.

На фиг. 52 показаны результаты, полученные при анализе антигенсвязывающей способности антитела HuK5-70, антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 с использованием проточного цитометра.

Реактивность каждого антитела, показанного на фигуре, по отношению к клеткам НЕК293-hTROP-2 (фиг. 52А) и клеткам РК-59 (фиг. 52В) анализировали, используя FACS. Второе антитело отдельно использовали в качестве негативного контроля (заштриховано) и реактивность каждого антитела указывали серой линией.

На фиг. 53 показаны результаты, полученные при измерении антигенсвязывающей способности антитела HuK5-70 способом ELISA.

Антигенсвязывающую способность антитела K5-70 и антитела HuK5-70 анализировали согласно способу ELISA с использованием покрытия антигеном. Символ ▲ указывает результаты измерения антитела K5-70, и символ ● указывает результаты измерения антитела HuK5-70.

На фиг. 54 показаны результаты, полученные при измерении антигенсвязывающей способности антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 способом ELISA.

Антигенсвязывающую способность антитела T6-16, антитела HuT6-16-1 и HuT6-16-2 анализировали согласно способу ELISA с использованием покрытия антигеном. Символом ▲ показаны результаты измерения антитела T6-16, символом ● показаны результаты измерения антитела HuT6-16-1, и символом ■ показаны результаты измерения антитела HuT6-16-2.

На фиг. 55 показана противоопухолевая активность гуманизированного анти-hTROP-2-антитела (антитело HuK5-70) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480.

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS) и в группе введения антитела HuK5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. *P<0,05, **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 39-й день (день 39) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фиг. 55А. *P<0,05 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 56 показана зависимость от дозы противоопухолевая активность гуманизированного анти-hTROP-2-антитела (HuK5-70) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480.

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS) и в группах введения антитела HuK5-70 (○: 1 мг/кг массы тела, Δ: 5 мг/кг массы тела, □: 10 мг/кг массы тела) (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 48-й день (день 48) (последний день эксперимента) после трансплантации злокачественных клеток в тесте, показанном на фиг. 56А. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 57 показана зависимость от дозы противоопухолевая активность гуманизированного анти-hTROP-2-антитела (HuT6-16-2) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480.

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS) и в группах введения антитела HuT6-16-2 (○: 1 мг/кг массы тела, Δ: 5 мг/кг массы тела, □: 10 мг/кг массы тела) (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 48-й день (день 48) (последний день эксперимента) после трансплантации злокачественных клеток в тесте, показанном на фиг. 57А. *P<0,05 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 58 показана противоопухолевая активность анти-hTROP-2-антител мыши (K5-70 и T6-16) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной опухоли яичника человека SK-OV-3.

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS), в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) и в группе введения антитела T6-16 (10 мг/кг массы тела) (Δ) (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. *P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 56-й день (день 56) (последний день эксперимента) после трансплантации злокачественных клеток в тесте, показанном на фиг. 58А. *P<0,05 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 59 показана противоопухолевая активность мышиных анти-hTROP-2-антител (K5-70 и T6-16) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468.

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS), в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) и в группе введения антитела T6-16 (10 мг/кг массы тела) (Δ) (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 54-й день (день 54) (последний день эксперимента) после трансплантации злокачественных клеток в тесте, показанном на фиг. 59А. *P<0,05, **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 60 показана противоопухолевая активность мышинных анти-hTROP-2-антител (K5-70 и T6-16) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3.

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS), в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) и в группе введения антитела T6-16 (10 мг/кг массы тела) (Δ) (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. *P<0,05, **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 41-й день (день 41) (последний день эксперимента) после трансплантации злокачественных клеток в тесте, показанном на фиг. 60А. *P<0,05, **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 61 показана противоопухолевая активность мышинового анти-hTROP-2-антитела K5-70 в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной опухоли желчных протоков человека TFK-1.

А: показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

В: показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 31-й день (день 31) (последний день эксперимента) после трансплантации злокачественных клеток в тесте, показанном на фиг. 61А. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 62 показаны результаты, полученные при анализе активности связывания антител HuK5-70 и HuT6-16-2 согласно способу ELISA с использованием покрытия антигеном с низкой плотностью. 96-луночный планшет покрывали 0,1 мкг/мл рекомбинантного белка hTACSTD2-Fc-His, и затем тестируемыми антителами (антитела K5-70, HuK5-70, T6-16 и HuT6-16-2), которые были получены в концентрациях от 20 мкг/мл до серий двукратных разведений, давали возможность взаимодействовать с белком. На фиг. 62(A) в качестве тестируемых антител использовали антитела K5-70 (▲) и HuK5-70 (●) и на фиг. 62(B) в качестве тестируемых антител использовали антитела T6-16 (▲) и HuT6-16-2 (●).

На фиг. 63 показаны результаты, полученные при анализе активности связывания hTROP-2 с антителами K5-70 и HuK5-70 в ELISA. 96-луночный планшет покрывали антителами K5-70 и HuK5-70 через антитело против IgG мыши (специфичного к γ-цепи) и антитела против IgG1 человека (специфичного к Feγ), и затем таким антителам давали возможность взаимодействовать с белками hTROP-2-EC-His, которые были получены в концентрациях от 5 мкг/мл до серии двукратных разведений. Связывание такого белка hTROP-2-EC-His выявляли, используя антитело против His-метки. (▲) антитело K5-70 и (●) антитело HuK5-70.

На фиг. 64 показана нуклеотидная последовательность (верхний ряд; SEQ ID NO: 99) и аминокислотная последовательность (нижний ряд; SEQ ID NO: 35) гена K5-70 VH, который был получен синтезом гена. Что касается такой нуклеотидной последовательности, то сайт EcoRI (GAA TTC) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу, и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к 3'-концу. Аминокислотная последовательность показана однобуквенным кодом. Сигнальный пептид с N-концевой стороны показан курсивом. Подчеркнутый двумя чертами глутамин (Q) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *IYWIN*, *NIYPSDSYTNYNQKFKD* и *TSMADY*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (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 K5-70 показаны в SEQ ID NO: 36-38 соответственно.

На фиг. 65 показана нуклеотидная последовательность (верхний ряд; SEQ ID NO: 100) и аминокислотная последовательность (нижний ряд; SEQ ID NO: 40) гена K5-70 VL, который был получен синтезом гена. Что касается такой нуклеотидной последовательности, то сайт AgeI (ACC GGT) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу, и сайт BsiWI (CGT ACG) добавляли к 3'-концу. Аминокислотная последовательность показана однобуквенным кодом. Сигнальный пептид с N-концевой стороны показан курсивом. Подчеркнутая двумя чертами аспарагиновая кислота (D) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида.

Последовательности CDR (подчеркнуты; *RASQSIGTSH*, *YASESIS* и *QQNSWPFT*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона K5-70 показаны в SEQ ID NO: 41-43 соответственно.

На фиг. 66 показана активность связывания антител ChK5-70, HuK5-70, HuVH/MuVL (в котором VL антитела HuK5-70 заменена VL антитела K5-70) и MuVH/HuVL (в котором VH антитела HuK5-70 заменена VH антитела K5-70) с hTROP-2. 96-луночный планшет покрывали 0,1 мкг/мл рекомбинантного белка hTACSTD2-Fc-His. Надсадок культуры клеток, в которых тестируемые антитела (антитела ChK5-70, HuK5-70, HuVH/MuVL и MuVH/HuVL) были временно экспрессированы, разбавляли, получая концентрации антител 1, 0,1, 0,01 и 0,001 мкг/мл. Разбавленным таким образом тестируемым антителам да-

вали возможность взаимодействовать с антигеном. (▲) антитело ChK5-70, (△) антитело MuVH/HuVL, (○) антитело HuVH/MuVL и (●) антитело HuK5-70.

На фиг. 67 показаны аминокислотные последовательности VH HuK5-70 и мутанты с заменами аминокислот. Аминокислоты показаны однобуквенным кодом. Аминокислота в каждом мутанте с аминокислотной заменой, которая остается такой же, как аминокислота в VH HuK5-70, указана символом "-", и только аминокислоты в случае замены показаны однобуквенным кодом. Число над последовательностью показывает номер аминокислоты (Rabat с соавторами, 1991).

На фиг. 68 показана активность связывания антител ChK5-70, HuK5-70, HuK5-70 VH A40R (мутанта, в котором аланин в положении 40 VH антитела HuK5-70 заменен аргинином) и HuK5-70 VH R44G (мутанта, в котором аргинин в положении 44 VH антитела HuK5-70 заменен глицином) с hTROP-2. 96-луночный планшет покрывали 0,1 мкг/мл рекомбинантного белка hTACSTD2-Fc-His. Надосадок культуры клеток, в которые тестируемые антитела (антитела ChK5-70, HuK5-70, HuK5-70 VH A40R и HuK5-70 VH R44G) были временно экспрессированы, разбавляли, получая концентрации от 0,5 мкг/мл до серии двукратных разведений (шесть образцов). Разбавленным таким образом тестируемым антителам давали возможность взаимодействовать с антигеном. (▲) антитело ChK5-70, (△) антитело HuK5-70 VH R44G, (○) антитело HuK5-70 VH A40R и (●) антитело HuK5-70.

На фиг. 69 показана нуклеотидная последовательность (верхний ряд) и аминокислотная последовательность (нижний ряд) гена HuK5-70 VH R44G, который получали синтезом генов. Что касается такой нуклеотидной последовательности, то сайт EcoRI (GAA TTC) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу, и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к 3'-концу. Аминокислотная последовательность показана однобуквенным кодом. Сигнальный пептид с N-концевой стороны показан курсивом. Аминокислота (Q: глутамин) на N-концевой стороне зрелой VH подчеркнута двумя чертами, и последовательность CDR (Rabat с соавторами, 1991) подчеркнута.

На фиг. 70 показан SDS-ПААГ-анализ, осуществленный для очищенного антитела HuK5-70-2. Антитело HuK5-70-2 (1 мкг) загружали на 11% SDS-ПААГ-гель в восстанавливающих условиях. Дорожка 1: маркер молекулярной массы (Precision Plus Dual Standard (BIO-RAD)), дорожка 2: антитело HuK5-70-2. Числовое значение на фигуре слева указывает молекулярную массу.

На фиг. 71 показана активность связывания антител K5-70, HuK5-70 и HuK5-70-2 с hTROP-2. 96-луночный планшет покрывали 0,1 мкг/мл рекомбинантного белка hTACSTD2-Fc-His. Очищенные тестируемые антитела (антитела K5-70, HuK5-70 и HuK5-70-2) разбавляли, получая концентрации от 1 мкг/мл до серии двукратных разведений (десять образцов). Разбавленным таким образом тестируемым антителам давали возможность взаимодействовать с антигеном. (■) антитело K5-70, (△) антитело HuK5-70-2 и (●) антитело HuK5-70.

На фиг. 72А показана ADCC-активность гуманизированных анти-hTROP-2-антител (незаштрихованная колонка: HuK5-70 и заштрихованная колонка: HuT6-16-2). Более конкретно, антитело HuK5-70 и антитело HuT6-16-2 (оба в концентрациях 0, 0,1, 0,3, 1, 3 и 10 мкг/мл) и моноциты периферической крови здорового человека добавляли к линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480 и затем культивировали их в течение 6 ч. Затем измеряли активность LDH, высвобождаемой в надосадок культуры, так чтобы можно было измерить ADCC-активность (среднее значение \pm стандартное отклонение (N=3), эффектор/мишень (E/T) = 40). Концентрация антитела, равная 0, указывает, что антитело не добавляли. *P<0,05, **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 72В показана ADCC-активность гуманизированных анти-hTROP-2-антител (незаштрихованная колонка: HuK5-70, серая колонка: HuK5-70-2 и заштрихованная колонка: HuT6-16-2). Более конкретно, антитело HuK5-70, антитело HuK5-70-2 и антитело HuT6-16-2 (все в концентрациях 0, 0,3, 1, 3, 10 и 30 мкг/мл) и моноциты периферической крови здорового человека добавляли к линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (PK-59) и затем их культивировали в течение 6 ч. Затем измеряли активность LDH, высвобождаемой в надосадок культуры, для того, чтобы можно было измерить ADCC-активность (среднее значение \pm стандартное отклонение (N=3), эффектор/мишень (E/T) = 40). Концентрация антитела, равная 0, указывает, что антитело не добавляли. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фиг. 72С показана ADCC-активность гуманизированных анти-hTROP-2-антител (незаштрихованная колонка: HuK5-70, серая колонка: HuK5-70-2, и заштрихованная колонка: HuT6-16-2). Более конкретно, антитело HuK5-70, антитело HuK5-70-2 и антитело HuT6-16-2 (все в концентрациях 0, 0,3, 1, 3, 10 и 30 мкг/мл) и моноциты периферической крови здорового человека добавляли к линии клеток злокачественной опухоли простаты человека (PC-3) и затем их культивировали в течение 6 ч. Затем измеряли активность LDH, высвобождаемой в надосадок культуры, для того, чтобы можно было измерить ADCC-активность (среднее значение \pm стандартное отклонение (N=3), эффектор/мишень (E/T) = 40). Концентрация антитела, равная 0, указывает, что антитело не добавляли. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

Подробное описание изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано подробно. Следующее описание не предназначено для ограничения объема настоящего изобретения. Помимо следующих далее примеров, настоящее изобретение может быть модифицировано и может быть осуществлено в соответствующих случаях в рамках, которые не порочат настоящее изобретение.

Настоящее описание включает содержание в полном объеме, раскрытое в описании предварительной заявки на выдачу патента США № 61/562672 (поданной 22 ноября 2011 г.), которая является приоритетным документом для заявки на данное изобретение.

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

1. Сущность настоящего изобретения.

Как указано выше, hTROP-2 человека (hTROP-2) является мембранным белком типа 1 с одним трансмембранным доменом, имеющим полную длину, составляющую 323 аминокислотных остатка. Было известно, что ген hTROP-2 и его генный продукт экспрессируются в разных типах злокачественных клеток.

Как указано выше, требовалась разработка анти-hTROP-2-антитела (моноклонального анти-hTROP-2-антитела) или тому подобного, обладающего противоопухолевой активностью *in vivo*. При таких обстоятельствах авторы настоящего изобретения осуществили скрининг чрезвычайно большого количества клонов, и в результате авторы изобретения успешно получили клон, обладающий высокой противоопухолевой активностью *in vivo*. В частности, настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, которое специфично распознает внеклеточную область hTROP-2 *in vivo*, в частности моноклональному антителу, имеющему высокую аффинность пикомолярного (пМ) порядка. Антитело согласно настоящему изобретению чрезвычайно полезно, так как оно является моноклональным анти-hTROP-2-антителом (в частности, гуманизированным антителом), которое проявляет значимую ингибирующую рост опухолей активность в более низкой дозе, чем существующее анти-hTROP-2-антитело (например, в дозе 1/20), при его введении отдельно в виде "голого" антитела, и которое также проявляет значимую ингибирующую рост опухолей активность в моделях лечения мышей, несущих опухоли, в которых использованы различные типы злокачественных клеток человека.

2. Получение анти-hTROP-2-антитела.

(1) Получение антигена.

Информация, имеющая отношение к аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 2) hTROP-2, раскрыта под номером доступа NP 002344, например, на веб-сайте NCBI (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Информация, имеющая отношение к нуклеотидной последовательности (SEQ ID NO: 1), кодирующей аминокислотную последовательность hTROP-2, раскрыта под номером доступа NM 002353 на том же веб-сайте, который указан выше.

Можно использовать антиген, полипептид или пептид (который также просто называют пептидом), содержащий по меньшей мере часть (полную или часть) аминокислотной последовательности hTROP-2, и предпочтительно пептид, содержащий по меньшей мере часть (полную или часть) аминокислотной последовательности внеклеточной области hTROP-2. Внеклеточная область (включая сигнальный пептид) hTROP-2 представляет собой область, содержащую аминокислоты в положениях 1-274 аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2 (сигнальный пептид: аминокислоты в положениях 1-26). В настоящем описании в отношении пептида, используемого в качестве антигена, приведенное выше выражение "по меньшей мере часть аминокислотной последовательности" специально не ограничено длиной. Например, предпочтительными являются область, содержащая аминокислоты в положениях 1-145 из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2, и область, содержащая аминокислоты в положениях 14 6-274 из той же аминокислотной последовательности, которая описана выше.

Пептид, используемый в качестве антигена, может быть получен либо химическим синтезом, либо синтезом согласно способу генетической инженерии с использованием *Escherichia coli* или т.п. Можно применять способ, хорошо известный специалистам в данной области.

В том случае, когда пептид получают химическим синтезом, он может быть синтезирован хорошо известным способом синтеза пептидов. Кроме того, можно применять либо способ твердофазного синтеза, либо способ синтеза в жидкой фазе для синтеза пептидов. Также можно использовать коммерчески доступный синтезатор пептидов (например, PSSM-8 производства Shimadzu Corporation, и др.).

В том случае, когда пептид синтезируют способом генетической инженерии, сначала конструируют и синтезируют ДНК, кодирующую пептид. Конструирование и синтез такой ДНК могут быть осуществлены согласно способу ПЦП с использованием вектора, содержащего полноразмерный ген hTROP-2 или тому подобный в качестве матрицы, а также с использованием праймеров, сконструированных так, чтобы можно было синтезировать требуемую область ДНК. Затем ДНК лигируют в подходящий вектор, чтобы получить рекомбинантный вектор, используемый для экспрессии белка, и затем такой рекомбинантный вектор вводят в хозяина так, чтобы представляющий интерес ген мог экспрессироваться в хо-

зияне, получая таким образом 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, способную автономно реплицироваться в микроорганизме-хозяине. Кроме того, также можно использовать вирус животных или вирус насекомых. Чтобы получить рекомбинантный вектор, очищенную ДНК можно расщепить подходящими ферментами рестрикции, и затем расщепленную таким образом часть ДНК можно встроить в сайт такого фермента рестрикции или тому подобного в подходящей векторной ДНК так, чтобы лигировать ее с вектором. Тип хозяина, используемого для трансформации особым образом, 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 животных (клетки COS, клетки CHO и т.д.), клетки насекомых и насекомых. В качестве такого хозяина можно использовать млекопитающее, такое как коза. Способ введения рекомбинантного вектора в хозяина общеизвестен.

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

После окончания культивирования, когда представляющий интерес пептид продуцируется в клеточной массе или в клетках, пептид экстрагируют разрушением клеточной массы или клеток. С другой стороны, когда представляющий интерес пептид продуцируется вне клеточной массы или вне клеток, непосредственно используют культуральный раствор или клеточную массу или клетки удаляют из культурального раствора центрифугированием или тому подобным способом. Затем представляющий интерес пептид можно выделить и очистить, используя биохимические способы, обычно используемые для выделения и очистки пептидов, такие как преципитация сульфатом аммония, гель-фильтрация, ионообменная хроматография и аффинная хроматография, или в результате объединения указанных выше биохимических способов.

В настоящем изобретении пептид, используемый в качестве антигена, также можно получить в результате трансляции *in vitro* в случае использования бесклеточной системы синтеза. В данном случае могут быть применимы два способа, а именно, способ на основе использования РНК в качестве матрицы и способ с использованием ДНК в качестве матрицы (транскрипция/трансляция). В качестве такой бесклеточной системы синтеза можно использовать коммерчески доступную систему, такую как система Expressway™ (Invitrogen), система PURESYSTEM (зарегистрированное торговое название; Post Genome Institute) или система TNT (зарегистрированное торговое название; Promega).

Полученный таким образом пептид может связываться с подходящим белком-носителем, таким как бычий сывороточный альбумин (БСА), гемоцианин морского блюдечка "замочная скважина" (KLH), тиреоглобулин человека или γ -глобулин цыплят.

Кроме того, антиген может представлять собой пептид, состоящий из аминокислотной последовательности, содержащей делецию, замену или добавление одной или нескольких аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью hTROP-2 (SEQ ID NO: 2) или ее неполной последовательностью, которая описана выше. Можно использовать, например, пептид, состоящий из аминокислотной последовательности, в которой одна или несколько (предпочтительно одна или несколько (например, 1-10 и более предпочтительно 1-5)) аминокислот делетированы, или одна или несколько (предпочтительно одна или несколько (например, 1-10 и более предпочтительно 1-5)) аминокислот заменены другими аминокислотами, или одна или несколько (предпочтительно одна или несколько (например, 1-10 и более предпочтительно 1-5)) других аминокислот добавлены по сравнению с аминокислотной последовательностью hTROP-2 или ее неполной последовательностью.

В настоящем изобретении ген, который необходимо ввести в клетку, или тому подобное представляет собой ген, кодирующий белок hTROP-2 или его неполный фрагмент, или его мутантный белок или его фрагмент. В качестве такого гена можно использовать, например, ген, имеющий нуклеотидную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1, или ее неполную последовательность.

Кроме того, в качестве гена, который необходимо ввести в клетку, или тому подобное также можно использовать нуклеотидную последовательность, гибридизующуюся в жестких условиях с последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, и кодирующей белок, обладающий активностью hTROP-2, или ее неполной последовательности.

Выражение "жесткие условия", используемое в настоящем описании, означает условия промывки после завершения гибридизации. В качестве таких жестких условий используют концентрацию соли (натрия) в буфере от 10 до 500 мМ и температуру от 42 до 72°C, и предпочтительно указанное выше условие по концентрации соли составляет от 50 до 300 мМ, и температура составляет от 55 до 68°C.

Мутация может быть введена в ген известным способом, таким как способ Кункеля или способ образования дуплекса с пробелами, с использованием, например, набора для введения мутаций, который основан на использовании сайт-специфичного мутагенеза, такого как система для сайт-специфичного мутагенеза GeneTailor™ (производства Invitrogen) или система для сайт-специфичного мутагенеза Та-

KaRa (Mutan-K., Mutan-Super Express Km и т.д.; производства Takara Bio Inc.).

(2) Получение поликлонального антитела.

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

Доза антигена на животное может быть определена 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. Иммунизация может быть осуществлена, главным образом, посредством инъекции антигена в вену, подушечку лапы, подкожно или в брюшную полость животного. Кроме того, интервал иммунизации особым образом не ограничен, и иммунизацию осуществляют с интервалами от нескольких дней до нескольких недель, предпочтительно с интервалами в 1 неделю от 1 до 10 раз и предпочтительно 2 или 3 раза. От трех до семи дней после последнего дня иммунизации измеряют титр антител в ферментном иммуноанализе (ELISA или EIA), радиоиммуноанализе (РИА) или другими способами. В день, когда получают требуемый титр антител, может быть собрана кровь для получения антисыворотки. В описанном выше способе сбора антител в том случае, если необходимо очистить антитело, такое антитело можно очистить, выбрав подходящий способ из известных способов, таких как преципитация сульфатом аммония, ионообменная хроматография, хроматография на основе гель-фильтрации и аффинная хроматография, или в подходящем случае сочетание указанных выше способов. Затем измеряют реактивность поликлонального антитела в сыворотке способом ELISA или тому подобным.

(3) Получение моноклонального антитела.

(3-1) Сбор продуцирующих антитела клеток.

Анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению не ограничено, но предпочтительно является моноклональным антителом.

Приготовленный антиген вводят млекопитающему, такому как крыса, мышь или кролик, для иммунизации. Доза антигена на животное может быть определена в соответствующем случае в зависимости от присутствия или отсутствия адъюванта. В настоящем изобретении можно использовать такие же адъюванты, которые описаны выше. Также в изобретении можно применять такие же способы иммунизации, которые описаны выше. Через 1-6 дней и предпочтительно через 1-14 дней после дня последней иммунизации собирают клетки, продуцирующие антитела. Примеры таких продуцирующих антитела клеток включают клетки селезенки, клетки лимфатических узлов и клетки периферической крови. Из них предпочтительными являются клетки лимфатических узлов и клетки селезенки.

(3-2) Слияние клеток.

Чтобы получить гибридомы (линию клеток, продуцирующих антитела), осуществляли слияние продуцирующих антитела клеток с клетками миеломы. В качестве клеток миеломы, необходимых для слияния с продуцирующими антитела клетками, можно использовать общедоступные стабильные клетки животных, таких как мыши. Линией клеток, используемой в изобретении, предпочтительно является линия клеток, которая обладает избирательностью к лекарственному средству, не может жить в неслитом состоянии в селективной среде НАТ (содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин) и может выживать только в состоянии слияния с клетками, продуцирующими антитела.

Примеры клеток миеломы включают линии клеток миеломы мышей, такие как P3-X63-Ag8.653, P3-X63-Ag8(X63), P3-X63-Ag8.U1(P3U1), P3/NS I/1-Ag4-1(NS1) и Sp2/0-Ag14(Sp2/0). Клетки миеломы могут быть выбраны соответствующим образом с учетом совместимости с клетками, продуцирующими антитела.

Затем клетки миеломы сливают с клетками, продуцирующими антитела. Для такого слияния клеток продуцирующие антитела 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 между продуцирующими антитела клетками и клетками миеломы (продуцирующие антитела клетки:клетки миеломы) не ограничено. В общем, соотношение клеток предпочтительно составляет от 1:1 до 10:1 и более предпочтительно 3:1. Затем осуществляют реакцию слияния в присутствии стимулятора слияния клеток. В качестве такого стимулятора слияния клеток можно использовать полиэтиленгликоль, имеющий среднюю молекулярную массу от 1000 до 6000 Да, или т.п. Кроме того, также можно сливать продуцирующие антитела клетки с клетками миеломы, используя коммерчески доступное устройство для слияния клеток, в котором применяют электрическую стимуляцию (например, электропорацию).

(3-3) Селекция и клонирование гибридом.

Представляющие интерес гибридомы выбирают из клеток после обработки для слияния клеток. В качестве способа отбора гибридом суспензию клеток соответствующим образом разбавляют, например, средой RPMI-1640, содержащей фетальную сыворотку теленка, и затем разбавленный раствор разносят в планшете для микротитрования. Затем в каждую лунку добавляют селективную среду. При замене соответствующим образом селективной среды свежей селективной средой осуществляют культивирование. В

результате примерно через 14 дней после начала культивирования на селективной среде могут быть получены клетки, растущие на селективной среде, в качестве гибридом.

Затем осуществляют скрининг, чтобы исследовать, присутствует или нет антитело, взаимодействующее с hTROP-2, в надосадке культуры выросших гибридом. Скрининг гибридом может быть осуществлен согласно обычному способу, и, таким образом, способ скрининга особым образом не ограничен. Например, отбирают аликвоту из надосадка культуры растущих гибридом, находящихся в лунке, и затем осуществляют скрининг с использованием ELISA, EIA, РИА или т.п.

Клонирование слитых клеток может быть осуществлено способом лимитирующего разведения или т.п. Антитело, проявляющее высокую реакционную способность по отношению к hTROP-2, определяют с помощью проточной цитометрии или тому подобного способа и затем отбирают гибридому, продуцирующую такое антитело. Из отобранной гибридомы получают клон.

(3-4) Сбор моноклонального антитела.

В качестве способа культивирования созданной гибридомы и затем сбора моноклонального антитела из полученной культуры можно адаптировать обычный способ культивирования клеток, способ образования асцитов или т.п. Термин "культура", используемый в настоящем описании, означает обеспечение возможности роста гибридом в культуральных чашках или культуральном флаконе или обеспечение возможности роста гибридома в брюшной полости животного, как описано ниже.

В случае применения способа на основе культивирования клеток гибридомы культивируют в среде для клеток животных, такой как среда RPMI-1640, такой как содержащая 10% фетальной сыворотки теленка среда RPMI-1640, среда MEM или бессывороточная среда, в обычных условиях культивирования (например, 37°C, CO₂-концентрация 5%) в течение 7-14 дней, и затем антитело может быть получено из надосадка культуры.

В случае способа на основе образования асцитов примерно 1×10^7 гибридом вводят в брюшную полость животного того же вида, что и млекопитающее, из которого получают клетки миеломы, так чтобы обеспечить возможность для пролиферации больших количеств гибридом. Затем предпочтительно спустя 2-3 недели собирают асциты.

В описанных способах сбора антител, в том случае если необходимо очистить антитело, антитело можно очистить, выбрав соответствующим образом подходящий способ из известных способов, таких как преципитация сульфатом аммония, ионообменная хроматография, гель-фильтрация и аффинная хроматография, или сочетанием указанных выше способов.

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

Анти-hTROP-2-антителом согласно настоящему изобретению является антитело, обладающее противоопухолевой активностью *in vivo*.

Термин "противоопухолевая активность" используют в настоящем описании для обозначения средней активности, приводящей к гибели опухолевых клеток (злокачественных клеток), или активности в ингибировании опухолевого роста. Предпочтительные примеры такой противоопухолевой активности включают активность в ингибировании роста злокачественных клеток и активность в ингибировании ангиогенеза опухолей. Тип опухоли человека (опухолевых клеток), по отношению к которой антитело согласно настоящему изобретению способно проявлять противоопухолевую активность, включает разные типы известных опухолей человека, в которых экспрессия hTROP-2 была подтверждена. Тип такой опухоли человека особым образом не ограничен. Предпочтительными являются, например, один или два или больше типов, выбранных из разных опухолей человека, таких как рак поджелудочной железы человека, рак простаты человека, рак прямой и ободочной кишки человека, рак молочной железы человека, рак яичника человека, рак легкого человека и рак желчных протоков человека; и более предпочтительны один или два или больше типов, выбранных из рака поджелудочной железы человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака яичника человека и рака легкого человека. Еще более предпочтительны рак поджелудочной железы человека и/или рак прямой и ободочной кишки человека.

Кроме того, описанная выше опухоль может представлять собой рецидивирующую злокачественную опухоль или метастатическую злокачественную опухоль. Антитело согласно настоящему изобретению также способно проявлять превосходную противоопухолевую активность на таких типах опухолей.

Наличие противоопухолевой активности *in vivo* можно подтвердить, например используя мышь, несущую опухоль (модель ксенотрансплантатов у мышей), которой подкожно были трансплантированы требуемые опухолевые клетки, и затем вводя мыши антитело, которое получено, как описано выше. В данном случае антитело можно вводить сразу после трансплантации опухолевых клеток (модели профилактики). Альтернативно его можно вводить после подтверждения того, что трансплантированная опухоль достигла предварительно определяемого объема (модели лечения). Способ введения не ограничен. Например, антитело можно вводить один раз каждые три дня, каждую неделю, каждую десять дней или каждые две недели или посредством однократного введения (только один раз) в дозе от 5 до 20 мг/кг массы тела с использованием внутрибрюшинного введения или т.п. В случае моделей профилактики присутствие или отсутствие противоопухолевой активности и ее уровень можно оценить на основе частоты образования опухолей и объема опухолей. В случае моделей лечения присутствие или отсутствие

противоопухолевой активности и ее уровень можно оценить на основе объема опухолей.

В настоящем изобретении предпочтительным примером анти-hTROP-2-антитела, обладающего противоопухолевой активностью *in vivo*, является антитело, аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи которого показаны в SEQ ID NO: 36-38 соответственно и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи которого показаны в SEQ ID NO: 41-43 соответственно. Предпочтительным примером V-области Н-цепи является V-область Н-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 35. Предпочтительным примером V-области L-цепи является V-область L-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 40.

В качестве другого варианта анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению предпочтительным примером является антитело, аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи которого показаны в SEQ ID NO: 46-48 соответственно и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи которого показаны в SEQ ID NO: 51-53 соответственно. Предпочтительным примером V-области Н-цепи является V-область Н-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 45. Предпочтительным примером V-области L-цепи является V-область L-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 50.

Подобным образом в качестве следующего варианта анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению предпочтительным примером является антитело, аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи которого показаны в SEQ ID NO: 56-58 соответственно и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи которого показаны в SEQ ID NO: 61-63 соответственно. Предпочтительным примером V-области Н-цепи является V-область Н-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 55. Предпочтительным примером V-области L-цепи является V-область L-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 60.

Подобным образом, в качестве следующего варианта анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению предпочтительным примером является антитело, аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи которого показаны в SEQ ID NO: 66-68 соответственно и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи которого показаны в SEQ ID NO: 71-73 соответственно. Предпочтительным примером V-области Н-цепи является V-область Н-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 65. Предпочтительным примером V-области L-цепи является V-область L-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 70.

Более конкретно, в настоящем изобретении предпочтительные примеры анти-hTROP-2-антитела, обладающего противоопухолевой активностью *in vivo*, включают

моноклональное анти-hTROP-2-антитело (название клона: K5-70), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11251;

моноклональное анти-hTROP-2-антитело (название клона: K5-107), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11252;

моноклональное анти-hTROP-2-антитело (название клона: K5-116-2-1), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11253;

моноклональное анти-hTROP-2-антитело (название клона: T6-16), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11346; и

моноклональное анти-hTROP-2-антитело (название клона: T5-86), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11254.

В данном случае гибридома с номером доступа FERM BP-112 51 была названа "гибридомой мышшь-мышшь K5-70" и была депонирована 12 мая 2010 г.; гибридома с номером доступа FERM BP-11252 была названа "гибридомой мышшь-мышшь K5-107" и была депонирована 12 мая 2010 г.; гибридома с номером доступа FERM BP-11253 была названа "гибридомой мышшь-мышшь K5-116-2-1" и была депонирована 12 мая 2010 г.; гибридома с номером доступа FERM BP-11346 была названа "гибридомой мышшь-мышшь T6-16" и была депонирована 1 марта 2011 г; и гибридома с номером доступа FERM BP-11254 была названа "гибридомой мышшь-мышшь T5-86" и была депонирована 12 мая 2010 г. Все указанные гибридомы депонировали в международном депозитарии патентуемых организмов (IPOD), Национальном институте передовой промышленной науки и технологии, Независимом институте управления Министерства экономики, торговли и промышленности (the AIST, Tsukuba Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japan, почтовый индекс: 305-8566).

Кроме того, другим предпочтительным примером анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению является анти-hTROP-2-антитело, которое связывается с участком (например, эпитопом), с которым связывается (которое 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 будут приведены в пункте (3-6).
(3-6) Эпитоп анти-hTROP-2-антитела.

Тип эпитопа (антигенной детерминанты) анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению не ограничен при условии, что он составляет по меньшей мере часть hTROP-2 в качестве антигена. Например, таким эпитопом предпочтительно является по меньшей мере часть области, образованной удалением области, состоящей из аминокислот в положениях 252-260, из аминокислотной последовательности hTROP-2, показанной 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, кроме того, предпочтительно по меньшей мере часть области, состоящей из аминокислот в положениях 27-69, или области, состоящей из аминокислот в положениях 109-206. В частности, 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 часть, входящую в такую область, в аминокислотной последовательности hTROP-2, показанной в SEQ ID NO: 2. Кроме того, 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 часть, составляющую такую область. Анти-hTROP-2-антитело, которое распознает описанные выше области (связывается с описанными выше областями или частями, содержащими такие области), обладает, например, высокой активностью интернализации в опухолевые клетки, чрезвычайно полезно в качестве иммуноконъюгата, который описан далее.

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

Как описано выше, анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, обладающее высокой противоопухолевой активностью *in vivo* в низкой дозе. В частности, предпочтительно, чтобы данное анти-hTROP-2-антитело проявляло ингибирующую рост опухолей активность, составляющую 50% или больше (предпочтительно 80% или больше, более предпочтительно 90% или больше, еще более предпочтительно 95% или больше и, в частности, предпочтительно почти 100% (например, 98% или больше или 99% или больше)) в дозе (в виде "голого" антитела) 20 мг/кг массы тела или меньше (предпочтительно 10 мг/кг массы тела или меньше, более предпочтительно 5 мг/кг массы тела или меньше и еще более предпочтительно 1 мг/кг массы тела или меньше) в модели на животных, несущих опухоли.

В данном случае ингибирующую рост опухолей активность (%) можно вычислить, например используя следующую формулу:

Ингибирующая рост опухолей активность (%) = $100 - \left[\frac{\text{объем опухоли или масса опухоли в группе введения антитела}}{\text{объем опухоли или масса опухоли в контрольной группе}} \right] \times 100$.

Кроме того, анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно обладает противоопухолевой активностью по отношению к двум или большему количеству типов линий опухолевых клеток человека. Тип такой линии опухолевых клеток человека не ограничен. Например, такие линии опухолевых клеток человека представляют собой по меньшей мере два типа, выбранных из группы, состоящей из различных типов линий клеток злокачественных опухолей поджелудочной железы человека, линий клеток злокачественных опухолей простаты человека, линий клеток злокачественных опухолей прямой и ободочной кишки человека, линий клеток злокачественных опухолей молочной железы человека, линий клеток злокачественных опухолей яичника, линий клеток злокачественных опухолей легкого человека и линий клеток злокачественных опухолей желчных протоков человека. В частности, предпочтительные примеры таких линий опухолевых клеток человека включают по меньшей мере два типа, выбранных из группы, состоящей из линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-59, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека ВхРС-3, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека КР-3L, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека КР-2, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-1, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-45Н, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-45Р, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека ТСС-PAN2, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека SUIT-2, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека САСО-2, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека DLD-1, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека НСТ 116, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека ЛМТ-1, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека НСС1143, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека МСF-7, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека МДА-МВ-468, линии клеток злокачественной опухоли простаты человека DU145, линии клеток злокачественной опухоли простаты человека РС-3, линии клеток злокачественной

опухоли яичника человека SK-OV-3, линии клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3 и линии клеток злокачественной опухоли желчных протоков человека TFK-1. Из описанных выше двух или более типов линий опухолевых клеток человека более предпочтительными являются по меньшей мере два типа, выбранных из группы, состоящей из линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека VxPC-3, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, линии клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468 и линии клеток злокачественной опухоли яичника человека SK-OV-3.

Кроме того, анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению имеет константу диссоциации (значение K_d), составляющую предпочтительно $1,0 \times 10^{-10}$ М или меньше, более предпочтительно $1,0 \times 10^{-11}$ М или меньше и еще более предпочтительно $1,0 \times 10^{-12}$ М или меньше. В данном случае способность связывания (аффинность) антитела можно измерить в форме константы диссоциации (значение K_d), константы скорости диссоциации ($K_{дис.}$ [1/с]) или константы скорости ассоциации ($K_{асс.}$ [1/М.сек]), например, с использованием анализа Скатчарда или сенсора резонанса поверхностного плазмона, называемого *Biacore*. В качестве таких устройств *Biacore* можно использовать, например, *Biacore 3000*, *Biacore 2000*, *Biacore X*, *Biacore J* и *Biacore Q* (все производства *Biacore*). Предпочтительно, чтобы антитело имело значение константы диссоциации (значение K_d) низкое, насколько это возможно, поскольку оно может иметь высокую способность связывания (аффинность). Значение K_d определяют на основе двух параметров $K_{дис.}$ и $K_{асс.}$, и оно может быть выражено формулой: $K_d[M] = K_{дис.}/K_{асс.}$. В качестве способа вычисления значения K_d предпочтительно может быть выбран способ, описанный в примерах, которые приведены далее (в частности, в примере 10).

(4) Генетически рекомбинантное антитело и фрагмент антитела.

(4-1) Генетически рекомбинантное антитело.

В предпочтительном варианте анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению предлагается 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 полученного от мыши антитела с константной областью полученного от человека антитела (см. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6851-6855, (1984) и т.д.). В случае получения такого химерного антитела лигированное таким образом антитело может быть легко сконструировано способом генетической рекомбинации.

В случае получения гуманизированного антитела 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) получена от человека, а CDR получена от мыши (такой способ называют прививкой CDR (трансплантацией CDR)). Затем гуманизированную реконструированную вариабельную область человека лигируют с константной областью человека. Такой способ получения гуманизированного антитела хорошо известен в данной области (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 JP (Kohyo) No. 4-502408 A (1992) (патент Японии № 2828340; *Queen et al.*) и т.д.).

В данном случае тип последовательности CDR, полученной от мыши, которую можно использовать в гуманизированном анти-hTROP-2-антителе согласно настоящему изобретению, особым образом не ограничен. Например, аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 36-38, или аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 66-68, предпочтительно используют в качестве CDR 1-3 V-области H-цепи (VH) соответственно. Аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 41-43, или аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 71-73, предпочтительно используют в качестве CDR 1-3 V-области L-цепи (VL) соответственно.

Кроме того, предпочтительные примеры аминокислотной последовательности V-области H-цепи в гуманизированной реконструированной вариабельной области человека включают

аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 92 (содержащую CDR 1-3, состоящие из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO: 36-38; аминокислотная последовательность, дополнительно содержащая сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO: 75);

аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 98 (содержащую CDR 1-3, состоящие из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO: 36-38; аминокислотная последовательность, дополнительно содержащая сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO: 97);

аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 94 (содержащую CDR 1-3, состоящие из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO: 66-68; аминокислотная последовательность, дополнительно содержащая сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO: 79); и

аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 95 (содержащую CDR 1-3, состоящие из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO: 66-68; аминокислотная последовательность, дополнительно содержащая сигнальный пептид показана в SEQ ID NO: 81).

В настоящем изобретении указанная выше аминокислотная последовательность V-области Н-цепи, показанная в SEQ ID NO: 98, представляет собой модифицированную аминокислотную последовательность, в которой аргинин (R) в положении 44 указанной выше аминокислотной последовательности V-области Н-цепи, показанной в SEQ ID NO: 92, заменен глицином (G).

Подобным образом, предпочтительные примеры аминокислотной последовательности V-области L-цепи в гуманизированной реконструированной вариабельной области человека включают

аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 93 (содержащую CDR 1-3, состоящие из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO: 41-43; и аминокислотная последовательность, дополнительно содержащая сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO: 77);

аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 96 (содержащую CDR 1-3, состоящие из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO: 71-73; аминокислотная последовательность, дополнительно содержащая сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO: 83).

В настоящем изобретении предпочтительные примеры гуманизированного анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению включают:

(i) гуманизированное анти-hTROP-2-антитело, аминокислотная последовательность V-области Н-цепи которого показана в SEQ ID NO: 92, и аминокислотная последовательность V-области L-цепи которого показана в SEQ ID NO: 93; и

(ii) гуманизированное анти-hTROP-2-антитело, аминокислотная последовательность V-области Н-цепи которого показана в SEQ ID NO: 98, и аминокислотная последовательность V-области L-цепи которого показана в SEQ ID NO: 93.

В частности, гуманизированное анти-hTROP-2-антитело, описанное в (ii), аминокислотная последовательность V-области Н-цепи которого показана в SEQ ID NO: 98, обладает улучшенной avidностью (т.е. гибкостью движения двух антигенсвязывающих плеч) и обладает высокой антигенсвязывающей активностью, и поэтому такое антитело является особенно предпочтительным.

Также другие предпочтительные примеры гуманизированного анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению включают:

(iii) гуманизированное анти-hTROP-2-антитело, аминокислотная последовательность V-области Н-цепи которого показана в SEQ ID NO: 94, и аминокислотная последовательность V-области L-цепи которого показана в SEQ ID NO: 96; и

(iv) гуманизированное анти-hTROP-2-антитело, аминокислотная последовательность V-области Н-цепи которого показана в SEQ ID NO: 95, и аминокислотная последовательность V-области L-цепи которого показана в SEQ ID NO: 96.

В общем, в случае антитела человека (полного антитела человека) его структура, содержащая гипервариабельную область, которая является антигенсвязывающим участком V-области, другие части V-области и константная область являются такими же, как в структуре антитела человека. Однако такой гипервариабельный участок также может быть получен от других животных. Способ получения антитела человека общеизвестен, и разработан способ получения генных последовательностей, которые являются общими у людей, с использованием генетической инженерии. Антитело человека может быть получено, например, способом с использованием мыши, продуцирующей антитело человека, которая имеет фрагменты хромосом человека, содержащие гены Н-цепи и L-цепи антитела человека (см. публикации 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. and 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 антитела человека из фагового дисплея, выбранного из библиотеки антител человека (см. публикации 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 указанных выше химерного антитела, гуманизированного антитела и антитела человека связанная N-гликозидной связью сахарная цепь в Fc-области антитела предпочтительно представляет собой сахарную цепь, в которой фукоза не связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливающем конце. Конкретным примером является антитело, состоящее из генетически рекомбинантных молекул антител, которое имеет в Fc-области молекул антител цепь сахара, в которой положение 1 фукозы не связано с положением 6 N-ацетилглюкозамина на восстанавливающем конце связанной N-гликозидной связью цепью сахара через α -связь. Такое антитело способно значительно улучшать ADCC-активность. Такое условие (характеристики связанной N-гликозидной связью цепи сахара в Fc-области антитела) также предпочтительно для указанного выше поликлонального антитела и моноклонального антитела.

(4-2) Фрагмент антитела.

Фрагмент анти-hTROP-2-антитела (частичный фрагмент) согласно настоящему изобретению включен в объем термина "антитело" согласно настоящему изобретению. В данном случае фрагмент антитела согласно настоящему изобретению обладает активностью связывания с hTROP-2 (а именно, он способен связываться с hTROP-2), а также обладает противоопухолевой активностью *in vivo*, как и в случае анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению.

Фрагмент антитела означает область части поликлонального анти-hTROP-2-антитела или моноклонального анти-hTROP-2-антитела (а именно, фрагмент антитела, полученный из анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению). Примеры такого фрагмента антитела включают пептиды, содержащие по меньшей мере в качестве его части, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv (вариабельный фрагмент антитела), одноцепное антитело (H-цепь, L-цепь, V-область H-цепи и V-область L-цепи и т.д.), scFv, диатело (димер scFv), dsFv (стабилизированную дисульфидом V-область) и определяющую комплементарность область (CDR).

Fab представляет собой фрагмент антитела с молекулярной массой примерно 50000, обладающий антигенсвязывающей активностью, который образован связыванием примерно половины H-цепи с N-концевой стороны с полной L-цепью дисульфидной связью, среди фрагментов, получаемых при обработке молекул антител протеазой папаином. Кроме того, также можно получить такой Fab встраиванием ДНК, кодирующей Fab антитела, в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии и затем введением вектора в клетку прокариота или эукариота так, чтобы обеспечить возможность для экспрессии в ней ДНК.

F(ab')₂ представляет собой фрагмент антитела с молекулярной массой примерно 100000, обладающий антигенсвязывающей активностью, размер которого немного больше, чем Fab, который связывается с Fab дисульфидной связью в шарнирной области, среди фрагментов, получаемых обработкой молекул антител протеазой пепсином. Кроме того, также можно получить такой F(ab')₂, используя связывание Fab тиоэфирной связью или дисульфидной связью, как описано далее.

Fab' представляет собой фрагмент антитела с молекулярной массой примерно 50000, обладающий антигенсвязывающей активностью, который образуется при расщеплении дисульфидной связи в шарнирной области указанного выше F(ab')₂- Кроме того, также можно получить такой Fab' встраиванием ДНК, кодирующей Fab'-фрагмент антитела в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии, и затем введением вектора в клетку прокариота или эукариота, так чтобы обеспечить в ней возможность экспрессии ДНК.

scFv представляет собой фрагмент антитела, обладающий антигенсвязывающей активностью, который представляет собой полипептид VH-P-VL или VL-P-VH, образованный лигированием одной V-области H-цепи (VH) с одной V-областью L-цепи (VL) с использованием подходящего пептидного линкера (P). Такой scFv может быть образован посредством получения кДНК, кодирующей VH и VL антитела, конструирования ДНК, кодирующей scFv, встраивания ДНК в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии и затем введения вектора в клетку прокариота или эукариота так, чтобы обеспечить в ней возможность экспрессии ДНК.

Диатело представляет собой фрагмент антитела, образованный димеризацией scFv, который обладает дивалентной антигенсвязывающей активностью. Такие дивалентные антигенсвязывающие активности могут быть идентичными друг другу или они также могут отличаться друг от друга. Такое диатело может быть создано посредством получения кДНК, кодирующей VH и VL антитела, конструирования ДНК, кодирующей scFv, так чтобы длина аминокислотной последовательности P составляла 8 остатков или меньше, встраивания ДНК в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии и затем введения вектора в клетку прокариота или эукариота так, чтобы обеспечить возможность экспрессии в ней ДНК.

dsFv представляет собой фрагмент антитела, образованный связыванием полипептидов, в которых один аминокислотный остаток в каждой VH и VL был заменен остатком цистеина, друг с другом дисульфидной связью между остатками цистеина. Аминокислотный остаток, заменяемый остатками цистеина, может быть выбран на основе оценки трехмерной структуры антитела согласно способу Reiter с соавторами (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994). Такой dsFv можно создать посредством получения кДНК, кодирующей VH и VL антитела, конструирования ДНК, кодирующей dsFv, встраивания ДНК в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии и затем введения вектора в клетку прокариота или эукариота так, чтобы обеспечить возможность экспрессии в ней ДНК.

Пептид, содержащий CDR, имеет по меньшей мере одну область CDR VH (CDR 1-3) и CDR VL (CDR 1-3). Более предпочтительные примеры такого пептида включают пептид, содержащий все CDR VH, и пептид, содержащий все CDR VL. Особенно предпочтительным примером пептида является пептид, содержащий все CDR VH и VL (всего 6 областей). Предпочтительные примеры аминокислотной последовательности такой CDR включают аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 36-38, 41-43, 46-48, 51-53, 56-58, 61-63, 66-68 и 71-73, которые описаны выше. Пептид, содержащий множественные CDR, может быть связан с другим пептидом непосредственно или через подходящий пептидный линкер. Такой пептид, содержащий CDR, можно получить посредством конструирования ДНК, кодирующей VH и VL антитела, встраивания ДНК в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии и затем введения вектора экспрессии в клетку прокариота или эукариота так, чтобы обеспечить возможность для экспрессии в ней ДНК. Кроме того, такой пептид, содержащий CDR, также может быть получен способами химического синтеза, такими как способ на основе Fmoc (способ с использованием флуоренилметилоксикарбонила) и способ на основе tBoc (способ с использованием трет-бутилоксикарбонила).

Фрагмент антитела согласно настоящему изобретению как таковой может представлять собой фрагмент антитела, который содержит часть или полную Fc-область антитела, в которой фукоза не связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливающем конце связанной N-гликозидной связью цепь сахара. В данном случае фрагмент антитела согласно настоящему изобретению также может представлять собой слитый белок, в котором указанный выше фрагмент антитела слит с частью или полной Fc-областью антитела, в которой фукоза не связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливающем конце связанной N-гликозидной связью цепи сахара. Такой фрагмент антитела способен значительно улучшать ADCC-активность, и поэтому он является предпочтительным.

Далее в описании настоящего изобретения вышеуказанные фрагменты антител также включены в объем термина "анти-hTROP-2-антитело" согласно настоящему изобретению.

3. Полинуклеотид, рекомбинантный вектор и трансформант.

В настоящем изобретении также предлагается полинуклеотид (ген, ДНК), кодирующий описанное выше анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению или фрагмент антитела. В частности, полинуклеотид согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую каждую аминокислотную последовательность, приведенную в качестве примера для описанного выше анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению или фрагмента такого антитела. Кроме того, полинуклеотид согласно настоящему изобретению может представлять собой либо полинуклеотид, состоящий только из полинуклеотида, кодирующего анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению или фрагмент такого антитела, или полинуклеотид, который содержит данный полинуклеотид в виде своей части, а также содержит известные нуклеотидные последовательности, необходимые для экспрессии генов (например, промотор транскрипции, SD-последовательность, последовательность Козака, терминатор и т.д.). Таким образом, тип полинуклеотида согласно настоящему изобретению не ограничен.

Что касается полинуклеотида, кодирующего анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению или фрагмент такого антитела, то кодоны, соответствующие отдельным аминокислотам, получаемым после трансляции, особым образом не ограничены. Полинуклеотид может содержать нуклеотиды ДНК, составляющие кодоны, обычно используемые у млекопитающих, таких как человек (предпочтительно, часто используемые кодоны), или также может содержать нуклеотиды ДНК, составляющие кодоны, обычно используемые у микроорганизмов, таких как *Escherichia coli* или дрожжи, растения и т.п. (предпочтительно часто используемые кодоны).

В настоящем изобретении также предлагается рекомбинантный вектор, содержащий описанный выше полинуклеотид согласно настоящему изобретению, или трансформант, содержащий рекомбинантный вектор.

Промотор транскрипции, SD-последовательность (в том случае, когда хозяином является прокариотическая клетка) и последовательность Козака (в том случае, когда хозяином является эукариотическая клетка) могут быть предварительно лигированы выше полинуклеотида (гена, ДНК), включаемого в вектор экспрессии, используемый в качестве рекомбинантного вектора. Кроме того, терминатор может быть лигирован ниже данного полинуклеотида. Кроме того, с полинуклеотидом могут быть лигированы энхансер, сигнал сплайсинга, дополнительный поли(А)-сигнал, селективный маркер и т.п. Отдельные элементы, необходимые для экспрессии генов, такие как описанный выше промотор транскрипции, могут входить в состав данного полинуклеотида с самого начала. Когда такие элементы исходно присутствуют в векторе экспрессии, они также могут быть использованы. Таким образом, использование отдельных элементов особым образом не ограничено.

В качестве способов включения полинуклеотида согласно настоящему изобретению в вектор экспрессии можно выбрать различные типы способов с использованием известных методик генетической рекомбинации, таких как способ с использованием ферментов рестрикции или способ с использованием топоизомеразы. Тип вектора экспрессии не ограничен при условии, что он способен сохранять полинуклеотид (ген, ДНК), кодирующий анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению или фрагмент такого антитела, и соответствующим образом может быть выбран и использован вектор, подходящий для применяемых клеток-хозяев. Примеры такого вектора экспрессии включают плазмидную ДНК, ДНК бактериофага, ДНК ретротраспозона, ретровирусный вектор и искусственную хромосомную ДНК.

Затем сконструированный таким образом рекомбинантный вектор вводят в хозяина, получая трансформант, и полученный трансформант затем культивируют так, чтобы анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению или фрагмент такого антитела могли экспрессироваться. Следует отметить, что термин "трансформант" используют в настоящем изобретении для обозначения хозяина, в которого был введен чужеродный ген. Примеры такого трансформанта включают хозяина, в которого был введен чужеродный ген посредством введения плазмидной ДНК или т.п. (трансформация); и хозяина, в которого был введен чужеродный ген посредством инфекции хозяина разными типами вирусов и фагов (трандукция).

Тип хозяина не ограничен при условии, что он способен экспрессировать анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению или фрагмент такого антитела после того, как описанный выше рекомбинантный вектор был введен в хозяина. Таким образом, хозяин может быть выбран соответствующим

щим образом. Примеры такого хозяина включают известных хозяев, таких как разные типы клеток животных, таких как клетки человека или мыши, и различные типы клеток растений, бактерий, дрожжей и клеток растений.

В случае использования клеток животных в качестве клеток-хозяев примеры таких клеток животных включают: фибробласты человека, клетки эмбриональной почки человека, клетки HEK293, клетки 293F, клетки CHO, клетки обезьян COS-7, Vero, L-клетки мыши, клетки GH3 крысы и клетки FL человека. Кроме того, также можно использовать клетки насекомых, такие как клетки Sf9 или клетки Sf21.

В случае использования бактерий в качестве хозяев примеры таких бактерий включают *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*.

В случае использования дрожжей в качестве хозяина примеры таких дрожжей включают *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*.

В случае использования клеток растений используют, например, клетки табака BY-2.

Способ получения трансформанта не ограничен, и его можно выбрать соответствующим образом, принимая во внимание сочетание типа хозяина и типа вектора экспрессии. Предпочтительные примеры способа получения трансформанта включают электропорацию, липофекцию, способ на основе теплового шока, ПЭГ, способ на основе фосфата кальция, способ на основе DEAE-декстрана и способ, основанный на инфицировании хозяина различными типами вирусов, такими как ДНК-вирус или РНК-вирус.

В полученном трансформанте тип кодонов полинуклеотида, входящего в состав рекомбинантного вектора, может быть идентичным или может отличаться от типа кодонов используемого хозяина. Таким образом, тип кодонов не ограничен.

4. Получение конъюгата антитело-лекарственное средство.

В качестве иммуноконъюгата, получаемого с использованием указанного выше анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению, может быть предложен конъюгат антитело-лекарственное средство, который содержит указанное выше антитело и вещество (соединение и т.д.), обладающее противоопухолевой активностью и/или активностью, вызывающей гибель клеток. Следует отметить, что конъюгат, образованный в результате предварительного получения указанной выше молекулы антитела и указанного выше вещества, обладающего противоопухолевой активностью и/или активностью, приводящей к гибели клеток, по отдельности и затем их объединения, обычно называют иммуноконъюгатом. С другой стороны, конъюгат, полученный лигированием белка-токсина, используемого в качестве такого вещества, обладающего противоопухолевой активностью и/или активностью, приводящей к гибели клеток, с антителом на уровне генов согласно способу генетической рекомбинации так, чтобы обеспечить возможность экспрессии в виде одного 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, приводящей к гибели клеток, включают сапорин, лизин, экзотоксин *Pseudomonas*, дифтерийный токсин и радиоактивный изотоп (RI). Из них предпочтительно используют сапорин и экзотоксин *Pseudomonas*. Тип RI, обладающего противоопухолевой активностью и/или активностью, приводящей к гибели клеток, особым образом 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 , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, $^{121\text{m}}\text{Tc}$, $^{122\text{m}}\text{Tc}$, $^{125\text{m}}\text{Tc}$, ^{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 дисульфидной связью или гидразоновой связью.

Указанное выше анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению является превосходным с точки зрения активности в интернализации в опухолевые клетки-мишени, которые экспрессируют hTROP-2. Таким образом, благодаря предварительному объединению вещества, обладающего противоопухолевой активностью и активностью, приводящей к гибели клеток, с анти-hTROP-2-антителом, становится возможным обеспечить возможность прямого и высокоизбирательного действия такого вещества на опухолевые клетки. Конъюгат антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению является очень хорошим с точки зрения способности доставлять средство в опухолевые клетки-мишени.

Активность в интернализации в клетки может быть оценена с использованием флуоресцентного мечения антитела родамином или тому подобным красителем и затем наблюдения поведения при миграции и локализации антитела с помощью флуоресцентного микроскопа или т.п.

Кроме того, в настоящем изобретении в дополнение к указанному выше конъюгату антитело-лекарственное средство также предлагается конъюгат фрагмент антитело-лекарственное средство, в котором вместо антитела используют указанный выше фрагмент антитела. Что касается подробностей, свя-

занных с таким конъюгатом фрагмент антитела-лекарственное средство, то в соответствующих случаях может быть применимо описание указанного выше конъюгата антитело-лекарственное средство.

Далее в описании настоящего изобретения такой конъюгат фрагмент антитела-лекарственное средство также включен в объем термина "конъюгат антитело-лекарственное средство" согласно настоящему изобретению.

5. Фармацевтическая композиция.

Анти-hTROP-2-антитело и конъюгат антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению применимы в качестве активных ингредиентов, входящих в состав фармацевтической композиции.

Фармацевтическая композиция применима в качестве фармацевтической композиции для лечения и/или диагностики опухоли. В частности, так как анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению и конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий указанное выше антитело, имеют превосходную ингибирующую рост опухолей активность, по существу противоопухолевую активность, они предпочтительно применимы для лечения опухоли. Иначе говоря, анти-hTROP-2-антитело и конъюгат антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению применимы в качестве активных ингредиентов, входящих в состав средства для терапии опухолей и средства для диагностики опухолей. Следует отметить, что описанное выше лечение опухоли включает ингибирование опухолевого роста и подавление роста опухолей. В частности, если средство представляет собой средство для терапии опухолей, то примеры средства для терапии опухолей включают ингибитор опухолевого роста и средство, подавляющее рост опухолей.

Предпочтительным является получение фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в форме фармацевтической композиции, содержащей анти-hTROP-2-антитело и/или конъюгат антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению в качестве активного ингредиента(ов) и дополнительно содержащей фармакологически приемлемый носитель. Кроме того, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть использована в сочетании с известными противоопухолевыми средствами. При таком комбинированном применении может быть получен более высокий противоопухолевый эффект.

Заболевания (опухоли), являющиеся мишенями, по отношению к которым применима фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению, включают указанные выше различные типы известных опухолей человека, в которых подтверждена экспрессия hTROP-2. Среди прочих, особенно предпочтительными являются один, или два, или больше типов, выбранных из различных типов опухолей человека, таких как рак поджелудочной железы человека, рак простаты человека, рак прямой и ободочной кишки человека, рак молочной железы человека, рак яичника человека, рак легкого человека и рак желчных протоков человека. Такое заболевание-мишень может представлять собой одно заболевание или могут развиваться два или больше заболеваний в сочетании. Кроме того, опухоль-мишень может представлять собой рецидивирующую злокачественную опухоль или метастатическую злокачественную опухоль. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению (кроме того, анти-hTROP-2-антитело и/или конъюгат антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению) можно эффективно применять в качестве терапевтического средства и диагностического средства в случае рецидивирующей злокачественной опухоли или метастатической злокачественной опухоли.

Примеры "фармакологически приемлемого носителя" включают эксципиент, разбавитель, наполнитель, дезинтегрирующее средство, стабилизатор, консервант, буфер, эмульгатор, ароматизатор, краситель, подсластитель, загуститель, корригент, солюбилизатор и другие добавки. С использованием одного или нескольких типов таких носителей фармацевтическая композиция может быть получена в форме инъекционного средства, жидкого средства, капсулы, суспензии, эмульсии, сиропа и т.д. Такие фармацевтические композиции можно вводить перорально или парентерально. Другой формой для парентерального введения является, например, инъекционное средство, содержащее один или несколько активных ингредиентов, которое получают обычным способом. Такое инъекционное средство может быть получено растворением или суспендированием антитела согласно настоящему изобретению в фармакологически приемлемом носителе, таком как физиологический раствор соли или коммерчески доступная дистиллированная вода, используемая для инъекции.

В частности, в том случае, когда фрагмент антитела, полученный из анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению (в частности, фрагмент антитела с низкой молекулярной массой) вводят в живой организм, в дополнение к указанным выше компонентам можно использовать коллоидную дисперсную систему. Предполагается, что такая коллоидная дисперсная система оказывает действие, повышающее стабильность соединения (фрагмента антитела) в живом организме или действие, способствующее эффективному транспорту такого соединения в конкретный орган, ткань или клетку. Тип такой коллоидной дисперсной системы не ограничен, при условии, что такой тип широко используется. Примеры такой коллоидной дисперсной системы включают дисперсные системы, содержащие в качестве основы полиэтиленгликоль, конъюгат макромолекул, агрегированные макромолекулы, нанокapsулу, микросферу, шарики и липиды, включая эмульгатор масла в воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Предпочтительные примеры таких коллоидных дисперсных системы включают многочисленные липо-

сомы и везикулы из искусственных мембран, действие которых заключается в эффективном транспорте 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).

Дозы фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению различаются в зависимости от возраста, пола, массы тела и симптомов пациента, терапевтических эффектов, способа введения, времени лечения, типа анти-hTROP-2-антитела и конъюгата антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению, входящих в состав фармацевтической композиции, и т.д. В общем, фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно вводить в диапазоне от 600 мкг до 6000 мг для взрослого человека за одно введение. Однако доза не ограничена указанным выше диапазоном.

В том случае, когда фармацевтическую композицию вводят, например, в форме инъекции, ее можно вводить в дозе от 100 мкг до 100 мг на введение на массу тела человека, однократно или дробно в несколько введений, в качестве средней суточной дозы. Предпочтительно фармацевтическую композицию можно вводить один раз каждые три дня, один раз в неделю, один раз каждые десять дней или один раз каждые две недели или при однократном введении (когда общее количество введений равно 1). Примеры дозируемой формы включают внутривенную инъекцию, подкожную инъекцию, интрадермальную инъекцию, внутримышечную инъекцию и внутрибрюшинную инъекцию. Из них предпочтительной является внутривенная инъекция. Кроме того, такое инъекционное средство можно получить в неводном разбавителе (например, полиэтиленгликоле, растительном масле, таком как оливковое масло, спиртах, таких как этанол и т.д.), в форме суспензии или эмульсии. Такое инъекционное средство можно стерилизовать посредством механической стерилизации с использованием фильтра, смешивания с бактерицидным средством и т.д. Инъекционное средство может быть получено в форме инъекционного средства, которое готовят перед применением. То есть, стерильную твердую композицию получают способом сушки вымораживанием или тому подобным и затем композицию растворяют в стерильной дистиллированной воде, используемой для инъекций, или других растворителях перед ее применением так, чтобы ее можно было затем использовать.

Настоящее изобретение относится к применению указанного выше анти-hTROP-2-антитела и/или конъюгата антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению для получения фармацевтического средства (лекарственного средства) для лечения и/или диагностики опухоли. Кроме того, настоящее изобретение относится к указанному выше анти-hTROP-2-антителу и/или конъюгату антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению, которые применяют для лечения и/или диагностики опухоли.

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

6. Способ выявления опухоли.

Способ выявления опухоли согласно настоящему изобретению отличается тем, что он включает обеспечение возможности взаимодействия указанного выше анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению с образцом, полученным из живого организма (далее называемым биологическим образцом), и регистрацию сигнала(ов) вступившего во взаимодействие антитела.

Как описано выше, было подтверждено, что hTROP-2 специфично экспрессируется в разных типах опухолевых клеток. Таким образом, hTROP-2 и, в частности, свободный hTROP-2 (часть внеклеточной области hTROP-2) можно использовать в качестве маркера различных типов опухолей. В частности, такой hTROP-2 предпочтительно можно использовать в качестве маркера рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека и рака молочной железы человека.

Поэтому анти-hTROP-2-антителу согласно настоящему изобретению обеспечивают возможность взаимодействия с биологическим образцом и затем регистрируют сигнал вступившего во взаимодействие антитела, чтобы выявить опухоль. Полученный сигнал антитела можно использовать в качестве показателя количества антигена в биологическом образце (т.е. количества hTROP-2 или количества свободного hTROP-2). При выявлении опухоли с использованием антитела согласно настоящему изобретению сначала позволяют биологическому образцу, собранному в качестве анализа от индивида, такому как срез ткани или кровь, используемому в качестве тестируемой мишени, связаться с антителом согласно настоящему изобретению в результате взаимодействия антиген-антитело. Затем на основании результатов измерения количества связанного антитела измеряют количество представляющего интерес антигена, находящегося в биологическом образце. Такое измерение можно осуществить в соответствии с известными способами иммуноанализа. Например, можно использовать способ иммунопреципитации, способ иммуноагглютинации, радиоиммуноанализ, иммунонефелометрию, Вестерн-блот-анализ, проточную

цитометрию и т.п. В случае радиоиммуноанализа используют меченое антитело и поэтому сигнал антитела выражают в количестве меченого антитела, которое выявляют непосредственно. В ином случае можно использовать раствор антитела, концентрация или титр антитела в котором известны, в качестве стандартного раствора, и при этом сигнал антитела к мишени может быть выражен в виде относительно количества. То есть, и стандартный раствор, и аналит можно измерить, используя измерительной устройство, и сигнал антитела в биологическом образце может быть выражен в виде значения относительно значения для стандартного раствора, используемого в качестве критерия. Примеры такого радиоиммуноанализа включают способ ELISA, способ EI, способ РИА, флуоресцентный иммуноанализ (FIA) и люминесцентный иммуноанализ. Из указанных анализов особенно предпочтительным является способ ELISA, который является простым и высокочувствительным.

В настоящем изобретении состояние опухоли можно оценить или диагностировать, используя результат указанным выше способом регистрации, в качестве показателя. Например, в том случае, когда результат регистрации превышает предварительно определяемое стандартное значение, статус опухоли определяют как позитивный в отношении опухоли, а когда результат регистрации меньше, чем предварительно определяемое стандартное значение, статус определяют как негативный в отношении опухоли. В случае опухолевой позитивности определяют, какой тип опухоли мог развиваться и таким образом оценивают статус опухоли. Термин "статус опухоли" в используемом в настоящем описании смысле означает присутствие или отсутствие развития опухоли или степень ее прогрессирования. Таким образом, конкретные примеры статуса опухоли включают присутствие или отсутствие развития опухоли, степень ее прогрессирования, степень злокачественности, присутствие или отсутствие метастазов и присутствие или отсутствие рецидивов.

В случае указанной выше оценки в качестве статуса опухоли, подвергаемой оценке, может быть выбран только один статус из указанных выше примеров или множество примеров можно объединить и выбрать. Присутствие или отсутствие опухоли можно оценить, определяя, развилась ли опухоль или нет, со ссылкой на предварительно определяемое стандартное значение, используемое в качестве пограничного, на основании полученного результата регистрации. Степень злокачественности используют в качестве показателя, который свидетельствует о степени прогрессирования злокачественной опухоли. На основании результата регистрации опухоль-мишень можно классифицировать, относя ее к определенной стадии заболевания, и ее можно оценить. В другом случае можно отличить друг от друга раннюю стадию злокачественной опухоли и позднюю стадию злокачественной опухоли, и затем их можно оценить. Например, также можно определить опухоль-мишень как злокачественную опухоль на ранней стадии или злокачественную опухоль на поздней стадии, используя результаты регистрации в качестве показателя. Метастазы опухоли можно оценивать, определяя, появилось ли новообразование в месте, отдаленном от положения начального поражения, используя результат регистрации в качестве показателя. Рецидив можно оценить, определяя, превысил ли снова или не превысил результат регистрации предварительно определяемое стандартное значение после промежуточной стадии или стадии ремиссии.

7. Набор для выявления или диагностики опухоли.

Анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению может быть представлено в форме набора для выявления или диагностики опухоли. Набор согласно настоящему изобретению содержит метящее вещество, твердофазный реагент, на котором антитело или меченое антитело было иммобилизовано, и т.д., а также указанное выше антитело. Метящее вещество, которое метит антитело, означает вещество, меченное ферментом, радиоактивным изотопом, флуоресцирующим соединением, хемилюминесцирующим соединением и т.д. Набор согласно настоящему изобретению также может содержать другие реагенты, используемые для осуществления выявления согласно настоящему изобретению, в дополнение к указанным выше составным элементам. Например, когда таким метящим веществом является меченое ферментом вещество, набор согласно настоящему изобретению может содержать субстрат фермента (хромогенный субстрат и т.д.), раствор для растворения субстрата фермента, раствор для остановки ферментативной реакции, разбавитель, используемый для аналитов, и т.д. Кроме того, набор согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать различные типы буферов, стерильную воду, различные типы сосудов для культивирования клеток, различные типы реакторов (пробирки Эппендорф и т.д.), блокирующий агент (компонент сыворотки, такой как бычий сывороточный альбумин (БСА), обезжиренное молоко или сыворотка козы), агент для промывки, поверхностно-активное вещество, различные типы планшетов, антисептик, такой как азид натрия, руководство по осуществлению экспериментальной процедуры (инструкцию) и т.д.

Набор согласно настоящему изобретению можно эффективно применять для осуществления указанного выше способа выявления согласно настоящему изобретению, и поэтому он является чрезвычайно полезным.

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

Пример 1.

Клонирование гена hTROP-2.

Полноразмерный ген hTROP-2 выделяли из печени плода человека (10-недельный эмбрион) согласно способу на основе ОТ-ПЦР. Сначала конструировали следующие ПЦР-праймеры на основе последовательности гена hTROP-2 (номер доступа в Genbank NM 002353).

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

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

Когда конструировали такие праймеры, последовательность, расщепляемую ферментом рестрикции XhoI, за исключением стоп-кодона, добавляли к обратному праймеру. кДНК синтезировали с суммарной РНК (TAKARA), полученной из печени плода человека (10-недельный эмбрион). Используя такую кДНК в качестве матрицы, осуществляли реакцию ПЦР с указанными выше праймерами. Затем осуществляли электрофорез в агарозном геле и экстракцию представляющей интерес полосы, и затем продукт клонировали в векторе pCRII (Invitrogen) (pCRII-hTROP-2). Клонированную кДНК hTROP-2 подтверждали секвенированием.

Вектор экспрессии конструировали отщеплением EcoRI/XhoI-фрагмента, содержащего ген hTROP-2 из pCRII-hTROP-2, и затем встраиванием фрагмента в сайт EcoRI/XhoI вектора pcDNA4/myc-His® A (Invitrogen) (pcDNA4-hTROP-2-myc/His). Кроме того HindIII/PmeI-фрагмент, содержащий ген hTROP-2, вырезали из pcDNA4-hTROP-2-myc/His (при этом часть, расщепляемая HindIII, имела тупые концы) и затем фрагмент встраивали в PmeI-сайт вектора pcDNA3.1(+)(Invitrogen), так чтобы сконструировать вектор экспрессии, содержащий ген резистентности к неомидину (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, который был получен 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), используя реагент липофектамин 2000 (Invitrogen), и затем осуществляли селекцию, используя антибиотик G418 (генетицин; GIBCO BRL). Затем закладывали 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, состоящую из аминокислот в положениях 1-263 из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2) амплифицировали способом ПЦР. В амплификации использовали следующие праймеры.

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

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

В такой ориентации расщепляемую ферментом рестрикции XhoI последовательность добавляли к обратному праймеру. Фрагмент ДНК, амплифицированный способом ПЦР, выявляли при электрофорезе в агарозном геле и затем его очищали, используя набор для экстракции из геля QIAquick (зарегистрированная торговая марка) (QIAGEN). Очищенный фрагмент ДНК субклонировали в векторе pCR Blunt (Invitrogen) (pCRB-hTROP-2 EC) и последовательность гена подтверждали. Затем EcoRI/XhoI-фрагмент, содержащий фрагмент гена, кодирующий внеклеточную область hTROP-2, вырезали из pCRB-hTROP-2 EC, и затем его встраивали в EcoRI/XhoI-сайт вектора pcDNA4/myc-His® A (Invitrogen) (pcDNA4mH-hTROP-2 EC). Кроме того, чтобы получить сайт расщепления ферментом рестрикции NruI, следующие олигонуклеотиды связывали и встраивали в BamHI/EcoRI-сайт pcDNA4mH-hTROP-2 EC.

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

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

Подобным образом линкер pBgl II (TAKARA) встраивали в PmeI-сайт pcDNA4mH-hTROP-2 EC (pcDNA4mH-NB-hTROP-2 EC). Чтобы получить рекомбинантный белок с использованием бакуловируса, NruI/BglII-фрагмент, содержащий фрагмент гена, кодирующий внеклеточную область hTROP-2, вырезали из pcDNA4mH-NB-hTROP-2 EC и затем его встраивали в NruI/BglII-сайт вектора pPSC8 (Nosan Corporation) (pPSC8-hTROP-2 EC). Получение рекомбинантного белка внеклеточной области hTROP-2 с использованием бакуловируса было поручено Nosan Corporation.

Рекомбинантный белок внеклеточной области hTROP-2 очищали следующим образом. Ni-сефарозу 6 Fast Flow (GE Healthcare Biosciences) добавляли к надосадку культуры, содержащему рекомбинантный белок, так чтобы обеспечить возможность для их связывания друг с другом, при 4°C в течение 2 ч. Затем полученный в результате продукт промывали фосфатным буфером, содержащим 20 мМ имидазола, используя колонку EconoColumn (BIO RAD), и затем элюировали фосфатным буфером, содержащим 300 мМ имидазола, осуществляя очистку.

Пример 4.

Выделение кДНК EpCAM человека и конструирование вектора экспрессии.

Полноразмерный ген EpCAM человека выделяли из печени плода человека (10-недельного эмбриона) согласно способу ОТ-ПЦР. Сначала конструировали следующие праймеры ПЦР на основе последовательности гена EpCAM человека (номер доступа в Genbank NM 002354).

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

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

При конструировании таких праймеров последовательность, расщепляемую ферментом рестрикции XhoI, за исключением стоп-кодона, добавляли к обратному праймеру. кДНК синтезировали с суммарной РНК (TAKARA) из печени плода человека (10-недельного эмбриона). Используя такую кДНК в качестве матрицы, осуществляли реакцию ПЦР с указанными выше праймерами. Затем осуществляли выявление электрофорезом в агарозном геле и экстракцию представляющей интерес полосы, и затем клонировали в векторе pCRII (Invitrogen) (pCRII-hEpCAM). Клонированную кДНК EpCAM человека подтверждали секвенированием.

Вектор экспрессии конструировали отщеплением EcoRI/XhoI-фрагмента, содержащего ген EpCAM человека, из pCRII-hEpCAM, и затем встраиванием фрагмента в EcoRI/XhoI-сайт вектора pcDNA4/myc-His® A (Invitrogen) (pcDNA4-hEpCAM-myc/His). Кроме того, HindIII/PmeI-фрагмент, содержащий ген EpCAM человека, вырезали из pcDNA4-hEpCAM-myc/His (при этом часть, отщепляемая HindIII, имела тупой конец) и затем фрагмент встраивали в PmeI-сайт вектора pcDNA3.1(+) (Invitrogen), конструируя вектор экспрессии, содержащий ген резистентности к неомизину (pcDNA3.1-hEpCAM-myc/His).

Пример 5.

Получение моноклонального анти-hTROP-2-антитела.

В качестве иммуногенов использовали линии клеток, способных стабильно экспрессировать hTROP-2 (клетки HEK293-hTROP-2, клетки CHO-K1-hTROP-2 и клетки 7E2-C-hTROP-2); линию клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека, эндогенно экспрессирующую белок hTROP-2 на клеточной поверхности (PK-59, RCB1901; приобретенную из банка клеток RIKEN); и рекомбинантный белок внеклеточной области hTROP-2 получали описанным выше способом.

В случае линий клеток, способных стабильно экспрессировать hTROP-2, использовали 1×10^7 клеток и в случае рекомбинантного белка hTROP-2 использовали 20 мкг белка. Линии клеток или рекомбинантный белок смешивали с адьювантом TiterMax Gold (Funakoshi Corporation) в соотношении в смеси 1:1, получая эмульсию. Затем эмульсию инъецировали в две подушечки лап или брюшную полость мыши (C57/BL6, Balb/c) (начальная иммунизация). Когда иммунизацию осуществляли путем инъекции в две подушечки лап в течение короткого периода времени, проводили бустер-иммунизацию через 3-10 дней после начальной иммунизации. На следующий день после последней иммунизации собирали лимфатические узлы из обоих колен и затем получали лимфоциты. Когда иммунизацию осуществляли путем инъекции в брюшную полость в течение длительного периода времени, бустер-иммунизации проводили с интервалами раз в неделю после начальной иммунизации (при этом бустер-иммунизации осуществляли в течение 1-2 месяцев). Затем выделяли В-клетки из селезенки обычным способом. В случае иммунизации с использованием в качестве иммуногенов клеток для бустер-иммунизаций использовали суспензию клеток, которая представляла собой PBS, содержащий 5×10^6 клеток. В случае использования белка в качестве иммуногена использовали 5 мкг раствора в PBS.

Полученные лимфоциты смешивали с линией клеток миеломы мышей (P3-X63-Ag8.653) в соотношении в смеси 3:1 и осуществляли слияние клеток согласно способу с использованием полиэтиленгликоля. Затем слитые клетки культивировали в течение 7-28 дней в среде с метилцеллюлозой (торговое название: среда для клонирования ClonaCell-HY D; стволовые клетки), которая содержала НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Каждую из отдельных колоний выросших гибридом собирали и помещали в 96-луночный планшет с плоским дном и, используя жидкую селективную среду, содержащую НАТ, гибридомы культивировали в инкубаторе с 5% CO₂. Надосадок культуры выросших гибридом из отдельных колоний подвергали первичному скринингу в ELISA клеток (описанном далее) и затем вторичному скринингу в FACS-анализе, используя HuH-7-hTROP-2-клетки, PK-59, получая таким образом 300 типов гибридом, которые продуцируют моноклональные анти-hTROP-2-антитела, распознающие белки hTROP-2, экспрессируемые на клеточной поверхности живых клеток.

Пример 6.

Первичный скрининг с использованием ELISA клеток.

Клетки CHO-K1 (hTROP-2-негативный контроль; приобретали из Japan Health Sciences Foundation), клетки CHO-K1-hTROP-2 (или клетки HuH-7 (hTROP-2-негативный контроль; приобретали из Japan Health Sciences Foundation) и клетки HuH-7-hTROP-2 поочередно инокулировали в 96-луночный планшет для культивирования (BD Falcon) с плотностью клеток 3×10^4 клеток/лунку и затем клетки культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 1-2 дней. Среду для культивирования клеток удаляли декантированием. Затем клетки промывали охлажденным на льду PBS и затем обрабатывали 4% парафор-

мальдегидом-PBS в течение 5 мин для того, чтобы иммобилизовать клетки. Клетки промывали PBS, который был охлажден на льду, и затем готовили планшет для ELISA. Затем осуществляли ELISA согласно обычному способу. Конкретные операции будут описаны ниже.

Сначала осуществляли блокирование 2% раствором обезжиренного молока в PBS при комнатной температуре в течение от 30 мин до 1 ч. Затем добавляли надосадок культуры гибридом и затем давали возможность взаимодействовать при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем промывали 0,1% раствором твин 20-PBS три раза. В качестве второго антитела к полученной смеси добавляли меченное пероксидазой хрена (HRP) антитело против IgG мыши (GE Healthcare Biosciences), которое было разбавлено в 1000 раз блокирующим раствором, и затем они взаимодействовали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем полученную смесь промывали 0,1% раствором твин 20-PBS три раза. К полученному раствору добавляли раствор субстрата ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин: SIGMA), чтобы осуществить цветную реакцию, и затем реакцию останавливали добавлением 1 М серной кислоты. Затем измеряли оптическую плотность (405 нм), используя устройство для считывания микропланшетов, модель 550 (BIO RAD). Гибридомы, соответствующие надосадку культуры гибридом, имеющему высокое значение оптической плотности по сравнению с негативным контролем, подвергали крупномасштабному культивированию в 24-луночном планшете с плоским дном и затем подвергали вторичному скринингу с использованием FACS-анализа.

Пример 7.

Вторичный скрининг с использованием FACS-анализа.

Гибридомы, которые, как было обнаружено, были позитивными в описанном выше первичном скрининге с использованием ELISA клеток, подвергали вторичному скринингу с использованием FACS-анализа. При оценке клеток гибридом в качестве негативных контрольных клеток использовали клетки NuH-7, которые представляли собой клетки злокачественной опухоли печени человека, которые не экспрессируют hTROP-2, и реактивность по отношению к клеткам NuH-7-hTROP-2, которые стабильно экспрессировали hTROP-2, использовали в качестве индикатора. Затем осуществляли оценку на основании реактивности по отношению к клеткам PK-59 (RCB1901; приобретенные из банка клеток RIKEN), которые являются клетками злокачественной опухоли поджелудочной железы, эндогенно экспрессирующими белок hTROP-2 белок на клеточной поверхности.

Клетки извлекали из культуральной чашки обработкой трипсином и затем готовили суспензию клеток (плотность клеток: 2×10^6 клеток/мл). Надосадок культуры гибридом, которая была позитивной в первичном скрининге с использованием ELISA клеток, подвергали взаимодействию с 100 мкл клеточной суспензии при 4°C в течение 20 мин. Реакционную смесь промывали PBS и затем подвергали взаимодействию с PE-меченым IgG мыши (BD Pharmingen) (0,1 мкг) (4°C, 30 мин). Затем реакцию анализировали, используя FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

В результате получали примерно 300 типов гибридом, которые продуцируют моноклональное анти-hTROP-2-антитело, распознающее белок hTROP-2, экспрессируемый на клеточной поверхности живых клеток.

Пример 8.

Идентификация изотипа.

Изотип полученного моноклонального анти-hTROP-2-антитела идентифицировали, используя набор для изотипирования моноклональных антител мыши (Serotec), согласно способу, описанному в приложении к указанному выше набору.

Пример 9.

Образование асцитов и очистка TROP-2-антитела.

Клоны гибридом, полученные описанным выше способом, вводили с плотностью 3×10^6 клонов в брюшную полость мыши BALB/c nude, которой предварительно вводили 2,6,10,14-тетраметилпентадекана (пристана) (предварительно за семь дней). Спустя две недели собирали асциты. Кроме того, такие асциты подвергали преципитации каприловой кислотой и затем аффинной очистке с использованием колонки с белком G (HiTrap, белок G; GE Healthcare Biosciences) или колонки с белком A (HiTrap, белок A; GE Healthcare Biosciences), получая моноклональные анти-hTROP-2-антитела из отдельных клонов гибридом.

Пример 10.

Измерение аффинности связывания антигена (измерение значения K_d).

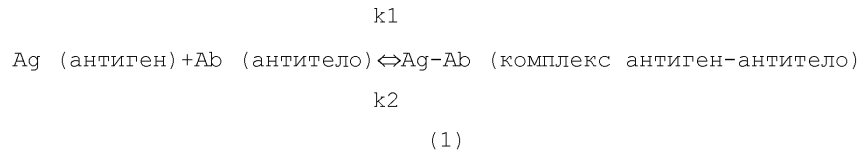
Аффинность связывания антигена (значение K_d) образованного моноклонального анти-hTROP-2-антитела вычисляли способом с использованием ELISA (Djavadi-Ohanian L. et al. (1996), в *Antibody Engineering*, Chapter 4, p. 77-97. IRL Press, Oxford).

В частности, очищенный рекомбинантный белок hTROP-2 (0,1 мкг/мл) добавляли в 96-луночный планшет для культивирования (Corning), для того чтобы покрыть планшет антигеном (при комнатной температуре в течение 1 ч или при 4°C в течение ночи). Затем планшет три раза промывали PBS и затем в него добавляли 2% обезжиренное молоко (раствор в PBS) для блокирования (при комнатной температуре в течение 1 ч). Полученный планшет дважды промывали PBS. Затем комплекс антиген-антитело,

который был образован ранее в результате смешивания раствора антигена (очищенный белок hTROP-2; 50, 25, 12,5, 6,25 или 3,125 нМ) с каждым клоном (0,5 нМ) моноклонального анти-hTROP-2-антитела и затем уравнивания смеси, добавляли к описанному выше планшету для ELISA и оставляли для взаимодействия (при комнатной температуре в течение 1 ч). Продукт реакции промывали PBS три раза и затем подвергали взаимодействию с HRP-меченым 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% раствором твин 20-PBS три раза и затем к полученному продукту добавляли раствор субстрата ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин: SIGMA), чтобы осуществить цветную реакцию. Затем к продукту реакции добавляли 1 М серную кислоту, чтобы остановить реакцию. Используя устройство для считывания микропланшетов, модель 550 (BIO RAD), измеряли оптическую плотность.

Использовали следующие выражения для вычисления, чтобы измерить константу диссоциации (K_d).

Согласно закону действия масс взаимодействие антиген-антитело представлено следующими выражениями:



В выражении (2) Agf означает концентрацию свободного антигена, Abf означает концентрацию свободного антитела и Ag-Ab означает концентрацию комплекса антиген-антитело. Если Ag-Ab=x, то концентрация свободного антитела представлена следующим выражением:

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

Поэтому указанное выше выражение (2) может быть в виде

$$K_d = \text{Agf} \times (\text{Abt} - x) / x \quad (4)$$

Если оба члена в выражении (4) умножить на $x/K_d \times \text{Abt}$, то

$$x/\text{Abt} = \text{Agf} \times (1 - x/\text{Abt}) \times 1/K_d$$

$$x/\text{Abt} \times 1/\text{Agf} = (1 - x/\text{Abt}) \times 1/K_d \quad (5)$$

Если $X = x/\text{Abt}$ и $Y = x/\text{Abt} \times \text{Agf}$ в выражении (5), то

$$Y = (1 - X) \times 1/K_d \quad (6)$$

На основании выражения (6) вычисляли значение K_d .

Значения K_d созданных 300 клонов моноклональных анти-hTROP-2-антител измеряли описанным выше способом. В результате было 133 клон, имеющих значение $K_d 1 \times 10^{-10}$ (М) или меньше, 59 клонов, имеющих значение $K_d 1 \times 10^{-11}$ (М) или меньше, и 2 клон, имеющих значение $K_d 1 \times 10^{-12}$ (М) или меньше.

Среди моноклональных анти-hTROP-2-антител, которые обладали ингибирующей рост опухолей активностью *in vivo*, было обнаружено, что значения K_d K5-70 (IgG2a мыши), T6-16 (IgG2a мыши), K5-107 (IgG1 мыши), K5-116-2-1 (IgG2a мыши) и T5-86 (IgG1 мыши) составляли $6,8 \times 10^{-12}$ 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

Значения K_d для моноклональных анти-hTROP-2-антител

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

Пример 11.

Реактивность моноклональных анти-hTROP-2-антител по отношению к линиям клеток злокачественных опухолей человека.

Линии клеток злокачественных опухолей человека (линии опухолевых клеток человека), используемые для такого исследования, приобретали из Health Science Research Resources Bank (HSRRB), банка клеток RIKEN (RIKEN), ATCC (американской коллекции типов культур), ECACC (европейской коллекции культур клеток) и DSMZ (немецкой коллекции микроорганизмов и культур клеток). В частности, использовали следующие линии злокачественных клеток.

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), ВхРС-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 обработкой трипсином и затем готовили суспензию клеток (плотность клеток: 2×10^6 клеток/мл). Моноклональное анти-hTROP-2-антитело (0,1 мкг) добавляли к 100 мкл клеточной суспензии, и затем они взаимодействовали при 4°C в течение 20 мин. Реакционный раствор промывали PBS и затем подвергали взаимодействию с PE-меченым антителом против IgG мыши (BD Biosciences Pharmingen) (0,1 мкг) (при 4°C в течение 30 мин). Затем анализировали результат, используя FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

Все созданные анти-hTROP-2-антитела не связывались с линией клеток злокачественной опухоли печени человека HuH-7, которая эндогенно не экспрессировала hTROP-2. С другой стороны, анти-hTROP-2-антитела связывались с клетками HuH-7-hTROP-2, в которых ген hTROP-2 стабильно экспрессировался (фиг. 2). Затем исследовали реактивность созданных моноклональных анти-hTROP-2-антител по отношению к линиям злокачественных клеток человека (в которых белок hTROP-2 эндогенно экспрессировался на клеточной поверхности), используя FACS-анализ. В результате все созданные 300 типов моноклональных анти-hTROP-2-антител связывались с линиями клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (PK-59 и ВхРС-3). В частности, все антитела K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 и T5-86, которые проявляли ингибирующую рост опухолей активность *in vivo*, связывались с линиями злокачественных клеток человека на высоком уровне. Например, при сравнении со случаем, в котором линии злокачественных клеток подвергали взаимодействию только с PE-меченым антителом против IgG мыши (BD Biosciences Pharmingen), указанные выше антитела проявляли следующую способность связывания с клетками PK-59 и клетками ВхРС-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) (с клетками 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) (с клетками ВхРС-3; фиг. 4).

Что касается линий злокачественных клеток человека, отличных от PK-59 и ВхРС-3, то среди 12 типов линий клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы моноклональные анти-hTROP-2-антител 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 линий линия клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека моноклональные анти-hTROP-2-антитела связывались с CACO-2, SW480, DLD-1 и HCT 116 и не связывались с COLO-320 и CW-2 (фиг. 6). Кроме того, моноклональные анти-hTROP-2-антитела связывались с JIMT-1 и HCC1143 (которые представляли собой линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека) и с PC-3 и DU145 (которые представляли собой линии клеток злокачественной опухоли простаты человека). Таким образом, они распознавали белки hTROP-2, эндогенно экспрессирующиеся на клеточной поверхности многих типов линий злокачественных клеток человека (фиг. 6).

Пример 12.

Перекрестная реактивность с белком TROP-2 мыши и белком TROP-1/ЕрСАМ человека.

В целях исследования специфичности созданных моноклональных анти-hTROP-2-антител определяли реактивность антител по отношению к белку TROP-2 мыши, имеющему гомологию 80% на уровне аминокислотной последовательности с белком hTROP-2, и по отношению к белку TROP-1/ЕрСАМ человека, имеющему гомологию 50% на уровне аминокислотной последовательности с белком hTROP-2, используя FACS-анализ.

В частности, вектор экспрессии (TROP-2-pcDNA3.1(+)) мыши, предоставленный Institute of Molecular and Cellular Biosciences, the University of Tokyo), содержащий полноразмерную кДНК гена TROP-2 мыши (номер доступа в Genbank NM 020047, Y08830), и вектор экспрессии (pcDNA3.1-hЕрСАМ-мус/His), содержащий полноразмерную кДНК гена TROP-1/ЕрСАМ человека (номер доступа в Genbank NM 002354), временно вводили в клетки CHO-K1, используя реагент липофектамин 2000 (Invitrogen). Затем спустя 24-48 ч клетки извлекали из культуральной чашки обработкой их трипсином и затем готовили суспензию клеток. Полученную таким образом суспензию клеток последовательно подвергали взаимодействию с полученным моноклональным анти-hTROP-2-антителом (0,1 мкг) и с PE-меченым антителом против IgG мыши и затем анализировали, используя FACSCalibur.

Антитело Т2-102 (IgG1 мыши), используемое в качестве позитивного контроля, которое проявляло перекрестную реактивность с TROP-2 мыши, проявляло высокую способность к связыванию с клетками CHO-K1, в которых ген TROP-2 мыши был временно экспрессирован. С другой стороны, антитела K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 и T5-86 не проявляли такой перекрестной реактивности по отношению к TROP-2 мыши (фиг. 7).

Подобным образом, моноклональное антитело против EpCAM человека (BD Biosciences Pharmingen), используемое в качестве позитивного контроля, проявляло высокую способность к связыванию с клетками CHO-K1, в которых EpCAM/TROP-1 человека был временно экспрессирован. С другой стороны, антитела K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 и T5-86 не проявляли перекрестной реактивности по отношению к EpCAM/TROP-1 человека (фиг. 8).

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

Пример 13.

Измерение ингибирующей рост активности.

В качестве способа исследования активности моноклонального анти-hTROP-2-антитела ингибировать функцию hTROP-2 оценивали влияние антитела на клеточный рост злокачественных клеток человека, которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности, измеряя количество живых клеток с использованием TetraColor ONE (Seikagaku Corporation). В частности, клетки PK-59 суспендировали в среде RPMI1640, содержащей 0,5% фетальной сыворотки теленка (производства BioWest), получая концентрацию клеток 2×10^5 клеток/мл, и затем по 100 мкл полученной клеточной суспензии добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета для культивирования. Затем в лунки добавляли IgG мыши (негативный контроль) и моноклональные анти-hTROP-2-антитела (конечные концентрации: 0,1 и 1 мкг/мл) и затем смеси культивировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 72 ч. В качестве контроля использовали коммерчески доступное моноклональное анти-hTROP-2-антитело (клон YY01, Santa Cruz). В лунки добавляли TetraColor ONE (Seikagaku Corporation) и затем подвергали взаимодействию в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 1-2 ч. После завершения реакции в 96-луночном планшете для культивирования непосредственно измеряли оптическую плотность при длине волны 490 нм (длина волны в контроле: 655 нм), используя устройство для считывания микропланшетов. Эксперимент осуществляли, используя по 3 лунки на каждую группу. Оценку значимых различий осуществляли согласно критерию Стьюдента и различия определяли как статистически значимые при $P < 0,05$.

Среди моноклональных анти-hTROP-2-антител, которые были созданы в компании авторов изобретения до настоящего времени, примерно 160 клонов были исследованы описанным выше способом в отношении их влияния на клеточный рост клеток PK-59. В результате было подтверждено, что T6-16, T5-86, K5-70 и K5-107, которые проявляли ингибирующую рост опухолей активность *in vivo*, обладали активностью, ингибирующей клеточный рост на 20-40%, по сравнению с IgG мыши (негативный контроль). Стало ясно, что такие анти-hTROP-2-антитела обладают активностью в связывании белков hTROP-2, которые экспрессировались на поверхности злокачественных клеток человека, нейтрализуя белки hTROP-2 и ингибируя рост злокачественных клеток (фиг. 9).

Пример 14.

Анализ зарастания царапины.

Влияние моноклонального анти-hTROP-2-антитела на способность злокачественных клеток человека к миграции оценивали в анализе зарастания царапины. Клетки PK-59 суспендировали в среде RPMI1640, содержащей 10% фетальную сыворотку теленка, в концентрации 3×10^5 клеток/мл и затем по 100 мкл полученной клеточной суспензии добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета для культивирования. После слияния клеток часть культивируемых в монослое клеток счищали кончиком наколочки, так чтобы сделать на планшете царапину в продольном направлении. Моноклональное анти-hTROP-2-антитело и IgG мыши, используемый в качестве негативного контроля, добавляли в среду до конечной концентрации 0,1 и 1 мкг/мл соответственно и затем осуществляли культивирование в течение 24 ч. Перед добавлением антитела (день 0) и через 24 ч культивирования (день 1) область счищенных клеток фотографировали и затем измеряли расстояние между клетками. Кроме того, площадь такой области со счищенными клетками количественно оценивали, используя компьютерную группу Scion Image. Эксперимент осуществляли, используя 8 лунок на каждую группу. Проверку значимого различия осуществляли, используя t-критерий Стьюдента, и определяли различие как статистически значимое при $P < 0,05$.

Исследовали влияние hTROP-2-антитела на способность к миграции клеток, проникающих в область царапины. Как и в случае анализа ингибирования клеточного роста, оценивали антитела, оказывающие полезные эффекты. В качестве способа оценки клетки фотографировали в 0 день (когда добавляли антитело) и в 1 день (через 24 ч после добавления антитела) и расстояние миграции (мкм) и площадь области царапины определяли, используя анализ изображения. В результате, как показано на фиг. 10, наблюдали четкие различия в способности клеток к миграции. Антитела T6-16 и K5-70, которые ис-

пользовали в данном тесте, обладали значимой ингибирующей рост клеток активностью по сравнению с контролем. Даже в тесте воспроизводимости наблюдали такую же тенденцию. В частности, в случае T6-16 $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента) и обнаружена корреляция с тестом *in vivo*.

Пример 15.

Оценка полезных эффектов моноклонального анти-hTROP-2-антитела у мышей, несущих опухоли.

Модель профилактики.

Линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы (PK-59 и VxPC-3), которые экспрессировали hTROP-2, собирали обработкой трипсином и к ним добавляли PBS, чтобы получить суспензию клеток, имеющую концентрацию 1×10^8 клеток/мл. Полученную таким образом суспензию клеток смешивали с равным количеством Matrigel (BD Biosciences Pharmingen) на льду. Используя шприц 26G, 100 мкл полученной смеси (5×10^6 клеток) инъецировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей nude 6-недельного возраста (Balb/c, nu/nu). В день трансплантации злокачественных клеток (день 1) мышей делили на группы и начинали введение антитела (1, 5 или 10 мг/кг массы тела, внутривентральное введение). Затем введение антитела продолжали с интервалами один раз каждые три дня. Противоопухолевую активность оценивали на основе частоты образования опухолей и объема опухолей. Объем опухолей вычисляли по следующей формуле:

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

Модель лечения.

Линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы (PK-59 и VxPC-3), которые экспрессировали hTROP-2, собирали обработкой трипсином и к ним добавляли PBS, чтобы получить суспензию клеток, имеющую концентрацию 1×10^8 клеток/мл. Полученную таким образом суспензию клеток смешивали с равным количеством Matrigel (BD Biosciences Pharmingen) на льду. Используя шприц 26G, 100 мкл полученной смеси (5×10^6 клеток) инъецировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей nude 6-недельного возраста (Balb/c, nu/nu). Через 5-6 дней после трансплантации злокачественных клеток мышей, объем опухолей у которых повысился до 50-150 мм³ (среднее значение: примерно 100 мм³), делили на группы. День, в который мышей делили на группы, определяли как первый день (день 1) и начинали введение антитела. Антитело вводили внутривентрально с интервалами один раз каждые три дня (10 мг/кг массы тела). Противоопухолевую активность оценивали по измерению объема опухолей. Проверку значимого различия осуществляли, используя t-критерий Стьюдента, и определяли различие как статистически значимое при $P < 0,05$.

Пример 16.

Анализ противоопухолевой активности моноклонального анти-hTROP-2-антитела *in vivo* в модели ксенотрансплантов злокачественных клеток поджелудочной железы человека.

В случае антитела, применяемого для лечения злокачественной опухоли, мишенью которого является hTROP-2, важно наличие активности, приводящей к специфичной гибели опухолевых тканей, экспрессирующих hTROP-2, или ингибированию роста опухоли в модели на основе ксенотрансплантатов.

Моноклональные анти-hTROP-2-антитела (примерно 160 клонов), которые были вновь получены в настоящем изобретении, оценивали с использованием моделей лечения ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы PK-59. Клетки PK-59 экспрессируют на своей поверхности EpCAM (фиг. 11A), действующий как маркер стволовых клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы (Chenwei Li, с соавторами, *Cancer Res.* 2007; 67: (3), 1030-1037), а также экспрессируют P-гликопротеин/MDR1 (фиг. 11B) и ABCG2/CDw338 (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 являются ABC-переносчиками, ассоциированными с резистентностью к лекарственным средствам. Кроме того, клетки PK-59 содержат фракцию клеток (8,93%) (фиг. 11D), позитивных как по CD24, так и по CD44, которые характерны для стволовых клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы, и полагают, что они являются высокозлокачественной линией клеток рака поджелудочной железы человека (Chenwei Li, et al., *Cancer Res.* 2007; 67: (3), 1030-1037, Jane E. Visvader and Geoffrey J. Lindeman. *Nat Rev. Cancer*, Vol. 8(10): 755-68, 2008).

Большинство вновь полученных примерно 160 клонов не проявляли полезных эффектов в моделях лечения ксенотрансплантатов клеток PK-59. Среди таких клонов были получены клоны, проявляющие значимую ингибирующую рост опухолей активность, а именно, клоны K5-70, T6-16, K5-107, T5-86 и K5-116-2-1.

В группе введения клона K5-70 (IgG2a мыши) скорость роста опухолей была статистически значимо ингибирована. На 21-й день после начала введения (день 21) объем опухолей в контрольной группе (N=14) составлял $1200,8 \pm 377,3$ мм³, тогда как объем опухолей в группе введения клона K5-70 составлял $748,7 \pm 175,0$ мм³ ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента) (фиг. 12A). Если объем опухолей в момент начала введения антитела был определен как равный 1,0, объем опухолей на 21-й день (день 21) составлял 7,8 в группе введения клона K5-70, тогда как объем опухолей в контрольной группе составлял 12,5 (фиг. 12A). Масса вырезанной опухоли составляла $0,43 \pm 0,14$ г ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента) в группе введения клона K5-70, тогда как масса вырезанной опухоли в контрольной группе составляла $0,73 \pm 0,26$ г. Таким

образом, клон К5-70 проявлял ингибирующую активность, составляющую примерно 60% (фиг. 12В).

Подобным образом, скорость роста опухолей была статистически значимо ингибирована даже в группе введения клона К5-107 (IgG1 мыши) (N=8), в группе введения клона Т6-16 (IgG2а мыши) (N=8), в группе введения клона Т5-86 (IgG1 мыши) и в группе введения клона К5-116-2-1 (IgG2а мыши) (N=8). На 17-й день после начала введения (день 17) объем опухолей 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, t-критерий Стьюдента) и $707,2 \pm 254,5$ мм³ (P<0,05, t-критерий Стьюдента) соответственно, тогда как объем опухолей в контрольной группе составлял $1039,3 \pm 271,6$ мм³. Подобным образом, на 16-й день после начала введения (день 16) объем опухолей в группе введения клона К5-116-2-1 (N=8) составлял $508,5 \pm 225,2$ мм³ (P<0,05, t-критерий Стьюдента), тогда как объем опухолей в контрольной группе (N=8) составлял $797,0 \pm 172,9$ мм³ (фиг. 13).

С другой стороны, в случае клона Т5-86 на 15-й день после начала введения (день 15) объем опухоли в группе введения клона Т5-86 (N=8) составлял $744,1 \pm 289,1$ мм³, тогда как объем опухолей в контрольной группе (N=8) составлял $1033,2 \pm 319,4$ мм³. Таким образом, не было обнаружено значимого различия в отношении объема опухолей. Однако при сравнении массы опухолей, которое осуществляли в тот же день, масса опухолей в группе введения клона Т5-86 составляла $0,44 \pm 0,13$ г (P<0,05, t-критерий Стьюдента), тогда как масса опухолей в контрольной группе составляла $0,62 \pm 0,14$ г. Таким образом, клон Т5-86 проявлял значимую ингибирующую активность.

Кроме того, что касается объема опухолей и массы опухолей, то отношение (Т/С) для каждой группы введения клона антитела к контрольной группе в последний день эксперимента показано в табл. 2 ниже. Как показано в табл. 2, антитело каждого клона проявляло значимую ингибирующую активность (Т/С = 62-72%) в каждой группе введения клона антитела.

Таблица 2

Группа	N (количество мышей)	Объем опухолей Т/С (%)	Масса опухолей 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 (t-критерий Стьюдента).

Кроме того, анализировали противоопухолевую активность каждого из клонов К5-70, Т6-16 и К5-116-2-1 в моделях профилактики ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы РК-59. После окончания введения антитела каждого клона рост опухолей был ингибирован у всех особей (N=8). На 18-й день после начала введения (день 18) объем опухолей в группе введения клона К5-70 (10 мг/кг массы тела) составлял $62,4 \pm 80,4$ мм³ (P<0,01, t-критерий Стьюдента), тогда как объем опухолей в контрольной группе (N=8) составлял $880,8 \pm 206,4$ мм³. Таким образом, клон К5-70 проявлял активность, ингибирующую рост опухолей на 92,9%. На 28-й день после начала введения (день 28) объем опухолей в группе введения клона Т6-16 (10 мг/кг массы тела) составлял $152,14 \pm 122,3$ мм³ (P<0,01, t-критерий Стьюдента), тогда как объем опухолей в контрольной группе (N=8) составлял $992,3 \pm 250,8$ мм³. Таким образом, клон Т6-16 проявлял активность, ингибирующую рост опухолей на 84,6%. На 20-й день после начала введения (день 20) объем опухолей в группе введения клона К5-116-2-1 (10 мг/кг массы тела) составлял $207,7 \pm 319,2$ мм³ (P<0,01, t-критерий Стьюдента), тогда как объем опухолей в контрольной группе (N=8) составлял $1159,4 \pm 413,3$ мм³. Таким образом, клон К5-116-2-1 проявлял активность, ингибирующую рост опухолей на 82,1% (фиг. 14 и табл. 3). Кроме того, во всех экспериментах не было значимого различия между контрольной группой и каждой из групп введения анти-hTROP-2-антител в отношении изменения средней массы тела в течение периода тестирования.

Что касается объема опухолей и массы опухолей, то отношение (Т/С) каждой группы введения клона антитела к контрольной группе в последний день эксперимента показано в табл. 3. Как показано в табл. 3, значимое ингибирование роста опухолей наблюдали в каждой группе введения клона антитела, и, в частности, значимый эффект, такой как Т/С = 10% или меньше, был подтвержден в группе введения клона К5-70.

Таблица 3

Группа	N (количество мышей)	Объем опухолей Т/С (%)	Масса опухолей Т/С (%)
K5-70	8	7,1**	5,8**
T6-16	8	15,3**	10,5**
K5-116-2-1	8	23,2**	21,5**

**P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

Известное анти-TROP-2-антитело AR47A6.4.2 (патент США № 7420041) оказывало ингибирующее рост опухолей действие в дозе 20 мг/кг в моделях профилактики ксенотрансплантатов при использовании различных линий злокачественных клеток человека. Такое анти-TROP-2-антитело AR47A6.4.2 ингибировало рост опухолей в случае линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PL45 почти на 100%. Однако такое антитело оказывало ингибирующее действие на опухоль в случае линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы VxPC-3 в процентах примерно на 50%, в случае линии клеток злокачественной опухоли простаты PC-3 в процентах примерно на 40%, в случае линии клеток злокачественной опухоли молочной железы MCF-7 в процентах примерно на 60% и в случае линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки Colo205 в процентах примерно на 40%. Напротив, анти-hTROP-2-антитело согласно изобретению, описанному в настоящей заявке, проявляло более высокий ингибирующий эффект на рост опухолей в дозе, составляющей половину от указанной выше дозы (10 мг/кг массы тела).

Пример 17.

Анализ противоопухолевой активности в моделях ксенотрансплантатов (модели профилактики и модели лечения) линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека VxPC-3.

Как и в случае использования описанных выше моделей лечения ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59, анализировали противоопухолевую активность клона K5-70 в моделях профилактики ксенотрансплантатов и моделях лечения ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека VxPC-3.

При сравнении с контрольной группой (N=8) рост опухолей в группе введения клона K-70 был значительно ингибирован. На 52-й день (день 52) объем опухолей в группе введения клона K5-70 (N=8) составлял $236,0 \pm 136,4$ мм³, тогда как объем опухолей в контрольной группе (N=8) составлял $616,3 \pm 266,8$ мм³. Таким образом, клон K-70 оказывал действие, ингибирующее рост опухолей на 61,7% (P<0,01, t-критерий Стьюдента) (фиг. 15).

На основании указанных выше результатов становится ясным, что моноклональное анти-hTROP-2-антитело проявляют значимую ингибирующую рост опухолей активность *in vivo* по меньшей мере на двух видах злокачественных клеток.

Пример 18.

Зависимая от дозы противоопухолевая активность анти-hTROP-2-антитела (клон K5-70) в моделях профилактики ксенотрансплантатов hTROP-2-экспрессирующей линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы (клетки PK-59).

В целях более подробного анализа ингибирующей рост опухолей активности *in vivo* анти-hTROP-2-антитела осуществляли тестирование зависимости от дозы. Как показано на фиг. 16, рост опухолей клеток PK-59 зависимым от дозы образом был ингибирован при введении антитела K5-70. На 21-й день после введения антитела (день 21) объем опухолей в контрольной группе (N=8) составлял $937,8 \pm 295,3$ мм³. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела K5-70 (1 мг/кг массы тела) (N=8) составлял $493,5 \pm 305,1$ мм³, что соответствует степени ингибирования на 50%, и объем опухолей в группе введения антитела K5-70 (5 мг/кг массы тела) (N=8) составлял $124,7 \pm 89,0$ мм³, что соответствует степени ингибирования 90%. Таким образом, становится очевидно, что по сравнению с известным анти-TROP-2-антителом AR47A6.4.2 (патент США № 7420041) анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению оказывает ингибирующее рост опухолей действие *in vivo*, эквивалентное действию анти-TROP-2-антитела AR47A6.4.2 в дозе 1/12 от дозы анти-TROP-2-антитела AR47A6.4.2, и что оно оказывает более высокий ингибирующий эффект, составляющий 90%, в дозе 1/4 от дозы известного антитела.

Пример 19.

Эпитопный анализ.

Получение химерного белка TROP-2 человека/мыши.

Ген TROP-2 человека/мыши получали согласно способу ПЦР. Конструировали праймеры для ПЦР, которые показаны ниже, на основе последовательности гена TROP-2 человека и последовательности гена TROP-2 мыши (номер доступа в Genbank NM 020047).

Праймеры TROP-2-С человека/мышь.

Y606 (прямое направление): 5'-
 cctgagcctacgctgacgaagtggcg-3' (SEQ ID NO:10)
 Y607 (обратное направление): 5'-
 cgcaccacttcgctgcagcgtaggctcagg-3' (SEQ ID NO:11)

Праймеры TROP-2-А человека/мышь.

Y612 (прямое направление): 5'-
 gactgctccacgctgacttccaagtgcctg-3' (SEQ ID NO:12)
 Y613 (обратное направление): 5'-
 caggcacttgaagtgcagcgtggagcagtc-3' SEQ ID NO:13)

Праймеры TROP-2-В человека/мышь.

Y614 (прямое направление): 5'-
 ctcgtaggacaacgatggcctctacgaccg-3' (SEQ ID NO:14)
 Y615 (обратное направление):
 5'-cgggtcgtagaggccatcggttgcacgag-3' (SEQ ID NO:15)

Праймеры TROP-2-Д человека/мышь.

Y608 (прямое направление): 5'-
 csaagcctgctgctgcatgagctggcg-3' (SEQ ID NO:16)
 Y609 (обратное направление): 5'-
 gcgcaccagctcatcgagcagcaggcttgg-3' (SEQ ID NO:17)

Праймеры TROP-2-Е человека/мышь.

Y616 (прямое направление): 5'-
 agttctctatccgctgactacgagcag-3' (SEQ ID NO:18)
 Y617 (обратное направление): 5'-
 ctgctcgtagtgaccgcgataggaagct-3' (SEQ ID NO:19)

Праймеры TROP-2-Ф человека/мышь.

Y618 (прямое направление): 5'-
 gacattaagcgcgagctctctattccagggc-3' (SEQ ID NO:20)
 Y619 (обратное направление): 5'-
 gccctggaatagagactcgcctttaatgtc-3' (SEQ ID NO:21)

Праймеры TROP-2 мышь.

Прямой праймер: 5'-ctactccacccccacctggcg-3' (SEQ ID NO:22)
 Обратный праймер: 5'-ctcgagcaagctaggttcgcttctc-3' (SEQ ID NO:23)

К обратному праймеру мышь TROP-2 добавляли последовательность, расщепляемую ферментом рестрикции XhoI, за исключением стоп-кодона. Схематичное представление полученных химерных белков TROP-2 человека/мышь показано на фиг. 17.

Химерный белок hmTROP-2-А представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 69 белка hTROP-2 и полипептида в диапазоне от аминокислоты в положении 64 до С-конца белка TROP-2 мышь. Химерный белок hmTROP-2-В представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 101 белка hTROP-2, и полипептида в диапазоне от аминокислоты в положении 96 до С-конца белка TROP-2 мышь. Химерный белок hmTROP-2-С представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 145 белка hTROP-2 и полипептида в диапазоне от аминокислоты в положении 140 до С-конца белка TROP-2 мышь. Химерный белок mhTROP-2-Д представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 139 белка TROP-2 мышь и полипептида в диапазоне от аминокислоты в положении 146 до С-конца белка hTROP-2. Химерный белок mhTROP-2-Е представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 187 белка TROP-2 мышь и полипептида в диапазоне от аминокислоты в положении 194 до С-конца белка hTROP-2. Химерный белок mhTROP-2-Ф представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 227 белка TROP-2 мышь и полипептида в диапазоне от аминокислоты в положении 234 до С-конца белка hTROP-2.

Векторы экспрессии, используемые для получения описанных выше химерных белков, специально конструировали следующими способами. Чтобы получить химерный ген hmTROP-2-А, ген hTROP-2 использовали в качестве матрицы и осуществляли ПЦР с использованием прямого праймера hTROP-2 и

праймера TROP-2-А человека/мышь Y613. Подобным образом, ген TROP-2 мыши использовали в качестве матрицы и осуществляли ПЦР с использованием праймера TROP-2-А человека/мышь Y612 и обратного праймера TROP-2 мыши. Фрагмент ДНК, амплифицированный в ПЦР, выявляли, используя акриламидный гель, и затем представляющую интерес полосу извлекали экстракцией. Затем два типа экстрагированных фрагментов ДНК смешивали, получая матрицу, и затем осуществляли ПЦР, используя прямой праймер hTROP-2 и обратный праймер TROP-2 мыши. Продукт ПЦР выявляли электрофорезом в агарозном геле и затем экстрагировали представляющий интерес фрагмент ДНК. Экстрагированный фрагмент ДНК клонировали в векторе pCR (зарегистрированная торговая марка)-Blunt (Invitrogen) (pCRB-hmTROP-2-А) и затем подтверждали последовательность гена. Вектор экспрессии для клеток животных получали удалением гена hTROP-2 из pcDNA3.1-hTROP-2-мус/His в результате расщепления EcoRI/XhoI и затем встраиванием в EcoRI/XhoI-фрагмента, содержащего химерный ген hmTROP-2-А, полученный из pCRB-hmTROP-2-А pcDNA3.1-hmTROP-2-А-мус/His). Кроме того, получали следующие химерные гены таким же способом, который описан выше, и конструировали векторы экспрессии:

hmTROP-2-В (используя прямой праймер TROP-2 человека, праймер TROP-2-В человека/мышь Y615, праймер TROP-2-В человека/мышь Y614 и обратный праймер TROP-2 мыши),

hmTROP-2-С (используя прямой праймер TROP-2 человека, праймер TROP-2-С человека/мышь Y607, праймер TROP-2-С человека/мышь Y606 и обратный праймер TROP-2 мыши),

mhTROP-2-Д (используя прямой праймер TROP-2 мыши, праймер TROP-2-Д мыши/человека Y609, праймер TROP-2-Д мыши/человека Y608 и обратный праймер TROP-2 человека),

mhTROP-2-Е (используя прямой праймер TROP-2 мыши, праймер TROP-2-Е мыши/человека Y617, праймер TROP-2-Е мыши/человека Y616 и обратный праймер TROP-2 человека),

mhTROP-2-Ф (используя прямой праймер TROP-2 мыши, праймер TROP-2-Ф мыши/человека Y619, праймер TROP-2-Ф мыши/человека Y618 и обратный праймер TROP-2 человека),

pcDNA3.1-hmTROP-2-В-мус/His, pcDNA3.1-hmTROP-2-С-мус/His, pcDNA3.1-mhTROP-2-Д-мус/His, pcDNA3.1-mhTROP-2-Е-мус/His и pcDNA3.1-mhTROP-2-Ф-мус/His).

Установление линий клеток HEK293, которые конститутивно экспрессируют hTROP-2, химерные белки TROP-2-С человека/мышь и TROP-2-Д мыши/человека.

Каждый из описанных выше векторов экспрессии pcDNA3.1-hTROP-2-мус/His, pcDNA3.1-hmTROP-2-С-мус/His и pcDNA3.1-mhTROP-2-Д-мус/His вводили в клетки HEK293. Селекцию осуществляли, используя антибиотик G418 (Calbiochem), и получали линии клеток HEK293, конститутивно экспрессирующие белок hTROP-2, химерный белок hmTROP-2-С и химерный белок mhTROP-2-Д.

Идентифицировали связывающие области моноклональных анти-hTROP-2-антител K5-70, T5-86, K5-107, T6-4, T6-16 и K5-116-2-1, которые оказывали полезное действие в моделях лечения ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы PK-59. Сначала исследовали реактивность моноклональных анти-hTROP-2-антител, оказывающих полезное действие в случае клеток HEK293, которые конститутивно экспрессируют химерные белки hmTROP-2-С и mhTROP-2-Д, в FACS-анализе (фиг. 18). В результате было обнаружено, что антитела K5-70, K5-107, T5-86 и K5-116-2-1 взаимодействовали с hmTROP-2-С, но такие антитела не взаимодействовали с mhTROP-2-Д. С другой стороны, антитела T6-4 и T6-16 взаимодействовали с mhTROP-2-Д, но они не взаимодействовали с hmTROP-2-С. На основании полученных результатов показано, что связывающая область каждого из антител K5-70, K5-107, T5-84 и K5-116-2-1 ограничена областью в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 145 hTROP-2 и связывающая область каждого из антител T6-4 и T6-16 ограничена областью в диапазоне от аминокислоты в положении 146 до C-концевой области hTROP-2 (фиг. 18).

Чтобы проанализировать связывающие области более подробно, получали векторы, используемые для экспрессии химерных белков hmTROP-2-А, hmTROP-2-В, mhTROP-2-Е и mhTROP-2-Ф, и анализировали реактивность химерных белков по отношению к моноклональным анти-hTROP-2-антителам, оказывающим полезное действие (фиг. 19). Каждый из вновь полученных векторов экспрессии, которые использовали для экспрессии химерных белков, вводили в клетки HEK293 и затем осуществляли FACS-анализ, используя клетки, которые временно экспрессировали химерные белки. Антитела K5-70, K5-107, T5-86 и K5-116-2-1 взаимодействовали с hmTROP-2-А, но не взаимодействовали с mhTROP-2-В. Все 6 исследованных типов моноклональных антител взаимодействовали с hTROP-2. Полученные результаты ясно показывают, что связывающая область антител K5-70, K5-107, T5-86 и K5-116-2-1 присутствует в области в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 69 в hTROP-2. Кроме того, антитела T6-4 и T6-16 не взаимодействовали ни с mhTROP-2-Е, ни с mhTROP-2-Ф. Такой результат свидетельствует о том, что такие антитела распознают область в диапазоне от аминокислоты в положении 146 до аминокислоты в положении 193 hTROP-2.

Пример 20. Иммуногистохимия.

Материалы/Способ.

Следующие матрицы нормальных тканей и тканей злокачественных опухолей использовали для иммуногистологического окрашивания.

Матрицы нормальных тканей человека:

Нормальные органы человека в двух повторах (№ в каталоге: AB1, Super Bio Chips).

Нормальные ткани, более чем в одном пятне (№ в каталоге: A103(VI), ISU ABXIS).

Матрицы тканей злокачественных опухолей легкого:

Рак легкого человека-метастазы-нормальная ткань (№ в каталоге: CCA3, Super Bio Chips).

Ткань карциномы легкого человека с краевой тканью, коровая биопсия в двух местах (№ в каталоге: OD-CT-RsLug03-002, Shanghai Outdo Biotech).

Матрица тканей злокачественных опухолей поджелудочной железы:

Ткани карциномы поджелудочной железы человека монопатологического типа из 60 случаев, коровая биопсия в двух местах (№ в каталоге: OD-CT-DgPan03-001, Shanghai Outdo Biotech)

Матрицы тканей злокачественных опухолей печени:

Гепатоклеточная карцинома, степени I-III с контролями в виде нормальных тканей, матрицы тканей 63 случаев (№ в каталоге: CS03-01-002U, Cybrdi).

Ткань карциномы печени человека монопатологического типа из 30 случаев, коровая биопсия в двух местах (№ в каталоге: OD-CT-DgLiv02-002, Shanghai Outdo Biotech).

Матрицы тканей злокачественных опухолей прямой и ободочной кишки:

Рак прямой и ободочной кишки человека (№ в каталоге: CD3, Super Bio Chips).

Карцинома ободочной кишки человека с краевой тканью, коровая биопсия в двух местах (№ в каталоге: OD-CT-DgCol03-002, Shanghai Outdo Biotech).

Матрицы тканей метастазов в лимфатических узлах и метастазов в печени из злокачественной опухоли прямой и ободочной кишки:

Матрица тканей злокачественных опухолей ободочной и прямой кишки (ободочной кишки и прямой кишки) с совместимыми тканями метастазов в лимфатических узлах, 44 случая/99 коровых биопсий, стекла из испытаний (№ в каталоге: CO991t, Biomax us).

Матрица тканей злокачественных опухолей ободочной и прямой кишки (ободочной кишки и прямой кишки) с совместимыми тканями метастазов в лимфатических узлах и нормальными близлежащими тканями, 43 случая/99 коровых биопсий (№ в каталоге: CO992, Biomax us).

Ткани злокачественных опухолей ободочной и прямой кишки метастазы в печени (№ в каталоге: A203(IV), ISU ABXIS).

Матрицы тканей злокачественных опухолей молочной железы:

Рак молочной железы человека-метастазы-нормальные ткани (№ в каталоге: CBA3, Super Bio Chips).

Карцинома молочной железы человека с краевой тканью, коровая биопсия в двух местах (№ в каталоге: OD-CT-RpBre03-002, Shanghai Outdo Biotech)

Матрицы тканей злокачественных опухолей желудка:

Рак желудка человека (№ в каталоге: CQ1, Super Bio Chips).

Карцинома желудка человека с краевой тканью, коровая биопсия в двух местах (№ в каталоге: OD-CT-DgStm03-002, Shanghai Outdo Biotech).

Матрица тканей злокачественных опухолей пищевода:

Рак пищевода человека (№ в каталоге: CR1, Super Bio Chips).

Карцинома пищевода человека с краевой тканью, коровые биопсии в двух местах (№ в каталоге: OD-CT-DgEso03-002, Shanghai Outdo Biotech).

Матрица тканей злокачественной опухоли яичника:

Злокачественная опухоль яичника человека (№ в каталоге: CJ1, Super Bio Chips).

Матрица тканей злокачественных опухолей простаты:

Рак простаты человека-нормальные ткани (№ в каталоге: CA3, Super Bio Chips).

Матрица тканей злокачественных опухолей мочевого пузыря:

Карцинома мочевого пузыря/переходно-клеточная карцинома, степени I-III с матрицами нормальных тканей (№ в каталоге: CC12-01-001U, Cybrdi).

Информацию о пациентах и клиническую информацию, относящуюся к описанным выше матрицам тканей, получали из листов с данными, прилагаемых к матрицам и на страницах отдельных компаний.

Способ иммуногистологического окрашивания.

После окончания обработки по депарафинизации стекла с матрицами тканей, содержащими нормальные ткани и ткани злокачественных опухолей человека, подвергали протеазной обработке пепсином при 37°C в течение 5 мин. Затем использовали срезы для иммунологического окрашивания с применением моноклонального анти-hTROP-2-антитела. Цветную реакцию осуществляли, используя DAB(3,3'-диаминобензидин) в качестве субстрата, и затем в качестве контрастного окрашивания осуществляли окрашивание ядер, используя гематоксилин.

Более конкретно такие способы осуществляли следующим образом. Залитый в парафин срез подвергали обработке для депарафинизации и затем подвергали протеазной обработке пепсином (DAKO) при 37°C в течение 5 мин. После активации антигена срез обрабатывали при комнатной температуре в течение 20 мин, используя раствор, полученный добавлением раствора пероксида водорода к метанолу

до конечной концентрации 0,3%, чтобы исключить активность эндогенной пероксидазы. Полученный продукт промывали PBS при комнатной температуре по 5 мин два раза и затем блокировали при комнатной температуре в течение 30 мин, используя раствор PBS, содержащий 1,5% нормальную сыворотку лошади (ДАКО), так чтобы осуществить операцию блокирования неспецифичного связывания в тканях. Затем полученный продукт подвергали взаимодействию с моноклональным анти-hTROP-2-антителом клона K5-63-17 (конечная концентрация: 10 мкг/мл), которое было разбавлено раствором PBS, содержащим 1,5% нормальной сыворотки лошади, при комнатной температуре в течение 1 ч и затем промывали PBS при комнатной температуре по 5 мин три раза. Затем подвергали взаимодействию с биотинилированным антителом против IgG мыши (Vector), которое было разбавлено в 200 раз раствором PBS, содержащим 1,5% нормальную сыворотку лошади, при комнатной температуре в течение 30 мин. Продукт реакции промывали PBS при комнатной температуре по 5 мин три раза и реагент из набора Vectastain ABC kit (Vector) смешивали в соответствии с инструкциями, включенными в набор, получая комплекс ABC. Такой комплекс ABC подвергали взаимодействию при комнатной температуре в течение 30 мин. Продукт реакции промывали PBS при комнатной температуре по 5 мин три раза и затем осуществляли развитие окраски, используя раствор простого красителя субстрата пероксидазы DAB Histofine (Nichirei Biosciences). После завершения развития окраски продукт реакции промывали деионизованной водой в течение 5 мин и ядро красили раствором гематоксилина по Майеру (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Затем осуществляли дегидратирование спиртом с последующим пропитыванием ксиленом и заливали в Entellan New (Merck Japan).

Результаты.

Экспрессия hTROP-2 в нормальных тканях человека.

Картину экспрессии hTROP-2 в нормальных тканях человека анализировали, используя моноклональное анти-hTROP-2-антитело клона K5-63-17. Матрицу нормальных тканей человека (№ в каталоге: AB1, Super Bio Chips) депарафинизировали и затем подвергали гидрофильной обработке. Затем антиген активировали протеазой, пепсином и затем осуществляли иммунологическое окрашивание, используя моноклональное анти-hTROP-2-антитело клона K5-63-17 (фиг. 20). В результате окрашивания наблюдали в коже, пищеводе, почке (коре и мозговом веществе), поджелудочной железе, простате, мочевом пузыре и миндалинах. Большинство окрашенных изображений было локализовано в клеточной мембране (фиг. 20А, В, С, D, F, G и H), но экспрессию hTROP-2 частично наблюдали даже в цитоплазме (фиг. 20Е и H). С другой стороны, такое окрашивание не наблюдали в сердце, печени, желудке, тонком кишечнике, толстом кишечнике, скелетных мышцах, легком, селезенке, тимусе и тому подобном (фиг. 20I и J).

Экспрессия hTROP-2 в тканях злокачественных опухолей человека.

Чтобы исследовать экспрессию hTROP-2 (hTROP-2-позитивная оценка) в тканях злокачественных опухолей человека, матрицы тканей злокачественных опухолей различных видов злокачественных опухолей человека иммунологически окрашивали, используя моноклональное анти-hTROP-2-антитело клона K5-63-17. Срез ткани, в котором 10% или больше злокачественных клеток были окрашены, определяли как hTROP-2-позитивный. Результаты окрашивания показаны в табл. 4.

Таблица 4

Ткани злокачественных опухолей	количество TROP-2-позитивных случаев/общее количество случаев	TROP-2-позитивная оценка (%)
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 ободочной кишки	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 простаты	35/38	92,1
Рак яичника	14/58	24,1

Типичные окрашенные изображения показаны на фиг. 21. Среди видов злокачественных опухолей, в которых была проанализирована экспрессия hTROP-2, рак простаты имел наиболее высокую позитивную оценку (92,1%), а также высокие позитивные оценки имели рак легкого (65,4%), рак пищевода (76,7%), рак мочевого пузыря (71,2%) и т.п. Рак печени имел наименьшую позитивную оценку (7,61%). На окрашенных изображениях было выявлено, что, как и в случае с нормальными клетками, hTROP-2 в большом количестве был локализован в клеточной мембране, даже в случае злокачественных клеток

(фиг. 21A-F, H и I). Кроме того, в некоторых случаях hTROP-2 также был локализован в цитоплазме (фиг. 21A, B, E и G).

hTROP-2-позитивная оценка злокачественной опухоли поджелудочной железы составляла 41,9%. Анализировали взаимосвязь между такой hTROP-2-позитивной оценкой и степенью развития (степенью дифференцировки) злокачественной опухоли поджелудочной железы. В результате hTROP-2 экспрессировался с высокой частотой в злокачественной опухоли поджелудочной железы с высокой степенью развития, а именно с низкой степенью дифференцировки (табл. 5).

Таблица 5

hTROP-2-позитивные пятна в случае рака поджелудочной железы 26/62 (41,94%)			
Степень	-	+	Позитивная оценка
I	8	0	0%
I-II	5	0	0%
II	19	21	52,5%
II-III	4	5	55,6%
Итого	36	26	p<0,01

Пример 21.

Противоопухолевая активность антитела K5-70 при однократном введении в моделях профилактики ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59.

Высокую противоопухолевую активность *in vivo* клона K5-70 (IgG2a мыши) наблюдали даже при однократном введении K5-70 в дозе 10 мг/кг массы тела в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59. В контрольной группе (IgG мыши, 10 мг/кг массы тела, N=3) образование опухолей наблюдали у всех особей, и объем опухолей на 28-й день после трансплантации клеток (день 28) составлял $781,7 \pm 74,5$ мм³. С другой стороны, в группе, в которой антитело K5-70 вводили только один раз в день трансплантации злокачественных клеток (день 1) (10 мг/кг массы тела, N=3), объем опухолей на 28 день составлял $144,4 \pm 176,9$ мм³ (P<0,05 t-критерий Стьюдента), что соответствует проявлению активности, ингибирующей рост опухолей на 81,5% (фиг. 22A). Что касается массы опухолей, то она в контрольной группе на 28 день составляла $0,59 \pm 0,06$ г. Напротив, масса опухолей в группе введения антитела клона K5-70 составляла $0,07 \pm 0,10$ г (P<0,01 t-критерий Стьюдента), что соответствует проявлению ингибирующей активности, составляющей 88% (фиг. 22B). Что касается объема опухолей и массы опухолей, то образование опухолей было полностью ингибировано у 2 из 3 особей в группе введения антитела K5-70 в дозе 10 мг/кг массы тела на введение (фиг. 22C).

Пример 22.

Противоопухолевая активность моноклонального анти-hTROP-2-антитела в моделях лечения ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480.

Исследовали противоопухолевую активность каждого из моноклональных анти-hTROP-2-антител (клоны K5-70, K5-116-2-1 и T6-16) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid 6-недельного возраста (день 1). Когда средний объем опухолей достигал 100 мм³, осуществляли деление на группы (день 7 или день 10). С 7 дня или 10 дня осуществляли внутрибрюшинное введение антитела с интервалами введения один раз каждые три дня. Противоопухолевую активность антитела клона K5-70 и противоопухолевые активности антитела клона K5-116-2-1 и антитела клона T6-16 оценивали в независимых исследованиях по отдельности. В исследовании по оценке противоопухолевой активности антитела K5-70 объем опухолей в контрольной группе (IgG мыши (10 мг/кг массы тела), N=8) на 44-й день после трансплантации злокачественных клеток (день 44) составлял $365,4 \pm 214,6$ мм³. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) составлял $27,4 \pm 29,4$ мм³ (P<0,01, t-критерий Стьюдента), и таким образом, образование опухолей было значимо ингибировано в группе введения K5-70 (степень ингибирования: 92,5%) (фиг. 23A). Что касается массы опухолей, то она в контрольной группе составляла $0,11 \pm 0,07$ г, тогда как масса опухолей в группе введения антитела K5-70 составляла $0,005 \pm 0,007$ (г) (P<0,01, t-критерий Стьюдента), что соответствует степени ингибирования 95,5% (фиг. 23B). В частности, у двух из восьми особей мышей в группе введения антитела K5-70 образование опухолей было полностью ингибировано, и присутствие опухолей не подтверждалось.

В исследованиях по оценке противоопухолевых активностей антитела K5-116-2-1 и антитела T6-16, которые осуществляли по отдельности, объем опухолей в контрольной группе на 42 день составлял $713,8 \pm 354,5$ мм³ (N=8). Напротив, объем опухолей в группе введения антитела K5-116-2-1 (10 мг/кг массы тела) составлял $188,9 \pm 97,4$ мм³ (N=8, P<0,01, t-критерий Стьюдента) (фиг. 24A), и объем опухолей в

группе введения антитела Т6-16 (10 мг/кг массы тела) составлял $292,8 \pm 199,7$ мм³ (N=8, P<0,05, t-критерий Стьюдента) (фиг. 25А). Таким образом, в двух указанных выше группах введения наблюдали степени ингибирования 73,5 и 59,0% соответственно. Что касается массы опухолей, то масса опухолей в контрольной группе составляла $0,39 \pm 0,19$ г. Напротив, масса опухолей в группе введения антитела К5-116-2-1 составляла $0,10 \pm 0,07$ г (P<0,01, t-критерий Стьюдента), и масса опухолей в группе введения антитела Т6-16 составляла $0,17 \pm 0,14$ г (P<0,05, t-критерий Стьюдента). Таким образом, в двух указанных выше группах введения наблюдали и степени ингибирования 72,2 и 56,4% соответственно (фиг. 24В и фиг. 25В).

Пример 23.

Зависимая от дозы противоопухолевая активность клона К5-70 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480.

Затем исследовали зависимую от дозы противоопухолевую активность антитела К5-70 с использованием моделей лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали в правый бок каждой самке мышей NOD-scid 6-недельного возраста. Через десять дней после трансплантации (день 10), когда средний объем опухолей достигал 100 мм³, мышей делили на группы: контрольную группу (IgG мыши, группа введения 10 мг/кг массы тела, N=8, $104,4 \pm 17,6$ мм³), группу введения антитела К5-70 (1 мг/кг массы тела) (N=8, $104,3 \pm 16,1$ мм³), группу введения антитела К5-70 (5 мг/кг массы тела) (N=8, $104,6 \pm 15,9$ мм³) и группу введения антитела К5-70 (10 мг/кг массы тела) (N=8, $104,8 \pm 14,9$ мм³). Затем осуществляли внутривентральное введение с интервалами введения один раз каждые три дня. На 42 день объем опухолей в контрольной группе составлял $713,8 \pm 354,5$ мм³. С другой стороны, в группах введения антитела К5-70 наблюдали зависимую от дозы активность в ингибировании образования опухолей. То есть, объем опухолей в группе введения 1 мг/кг массы тела составлял $485,0 \pm 207,3$ мм³ (степень ингибирования: 32,1%), объем опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела составлял $339,5 \pm 253,2$ мм³ (степень ингибирования: 52,4%), и объем опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составлял $355,4 \pm 202,8$ мм³ (степень ингибирования: 50,2%, P<0,05, t-критерий Стьюдента) (фиг. 26А). Подобным образом, что касается массы опухолей на 42 день, то масса опухолей в контрольной группе составляла $0,39 \pm 0,19$ г. С другой стороны, масса опухолей в группе введения антитела К5-70 (1 мг/кг массы тела) составляла $0,24 \pm 0,11$ г (степень ингибирования: 37,8%), масса опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела составляла $0,17 \pm 0,14$ г (степень ингибирования: 55,8%, P<0,05, t-критерий Стьюдента), и масса опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составляла $0,20 \pm 0,13$ г (степень ингибирования: 47,1%). Таким образом, подтверждали зависимую от дозы противоопухолевую активность (фиг. 26В).

Пример 24.

Анализ интервалов введения антитела К5-70 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480

Затем, чтобы проанализировать оптимальные интервалы введения антитела К5-70, исследовали противоопухолевую активность клона К5-70 при его введении один раз в неделю (один раз каждые 7 дней) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid 6-недельного возраста. Через 10 дней после трансплантации (день 10), когда средний объем опухолей достигал 100 мм³, мышей делили на группы: контрольную группу (IgG мыши, 10 мг/кг массы тела, N=8, $104,42 \pm 15,1$ мм³) и группу введения антитела К5-70 (10 мг/кг массы тела, N=8, $104,3 \pm 16,1$ мм³). Затем осуществляли внутривентральное введение один раз каждые 7 дней. На 42 день объем опухолей в контрольной группе составлял $713,8 \pm 354,5$ мм³, тогда как объем опухолей в группе введения антитела К5-70 (вводили один раз в неделю) составлял $332,3 \pm 239,9$ мм³ (степень ингибирования: 55%, P<0,05, t-критерий Стьюдента) (фиг. 27А). Кроме того, когда интервал введения увеличивали до одного раза каждые 10 дней и до одного раза каждые две недели, объем опухолей в контрольной группе на 39-й день составлял $956,9 \pm 367,8$ мм³. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела К5-70 (вводили один раз каждые 10 дней) на 39 день составлял $525,4 \pm 180,6$ мм³ (степень ингибирования: 45,1%, P<0,01, t-критерий Стьюдента), и объем опухолей в группе введения антитела К5-70 (вводили один раз каждые 2 недели) составлял $459,4 \pm 217,6$ мм³ (степень ингибирования: 52,0%, P<0,01, t-критерий Стьюдента) (фиг. 27В). В известном уровне техники (US 7420040 и US 7420041), когда антитела вводили в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы (ВхРС-3) в дозе 20 мг/кг массы тела, три раза в неделю (с интервалами введения 2 дня), антитела проявляли противоопухолевую активность со степенью ингибирования от 50 до 60%. Напротив, антитело К5-70 проявляло противоопухолевую активность, эквивалентную активностям, известным из предшествующего уровня техники, в дозе, составляющей половину от дозы, известной в предшествующем уровне техники (10 мг/кг массы тела), один раз каждые 2 недели (с интервалами введения 13 дней). Соответственно, стало очевидным, что антитело К5-70 проявляло значимую противоопухолевую активность в суммарной дозе, составляющей по меньшей мере 1/12 часть от

доз, используемых в известном уровне техники.

Пример 25.

Зависимая от дозы противоопухолевая активность антитела Т6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480.

Затем исследовали зависимость от дозы противоопухолевую активность антитела Т6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid 6-недельного возраста. Через десять дней после трансплантации (день 10), когда средний объем опухолей достигал 100 мм^3 , мышей делили на группы: контрольную группу (IgG мыши, 10 мг/кг массы тела, N=8, $105,8 \pm 9,9 \text{ мм}^3$), группу введения антитела Т6-16 (1 мг/кг массы тела, N=8, $104,4 \pm 13,3 \text{ мм}^3$), группу введения антитела Т6-16 (5 мг/кг массы тела, N=8, $104,7 \pm 13,0 \text{ мм}^3$) и группу введения антитела Т6-16 (10 мг/кг массы тела, N=8, $104,8 \pm 12,4 \text{ мм}^3$). Затем осуществляли внутрибрюшинное введение с интервалами введения один раз каждые три дня. На 43 день объем опухолей в контрольной группе составлял $473,5 \pm 137,0 \text{ мм}^3$. С другой стороны, в группах введения антитела Т6-16 наблюдали зависимость от дозы активность в ингибировании образования опухолей. А именно, объем опухолей в группе введения 1 мг/кг массы тела составлял $397,9 \pm 97,5 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 16,0%), объем опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела составлял $195,9 \pm 89,7 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 58,7%, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и объем опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составлял $190,2 \pm 56,5 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 59,8 %, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента) (фиг. 28А). Подобным образом, что касается массы опухолей на 43-й день, то она в контрольной группе составляла $0,19 \pm 0,07 \text{ г}$. С другой стороны, масса опухолей в группе введения антитела Т6-16 (1 мг/кг массы тела) составляла $0,20 \pm 0,08 \text{ г}$, масса опухолей в группе введения антитела Т6-16 (5 мг/кг массы тела) составляла $0,08 \pm 0,04 \text{ г}$ (степень ингибирования: 57,9%, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и масса опухолей в группе введения антитела Т6-16 (10 мг/кг массы тела) составляла $0,09 \pm 0,04 \text{ г}$ (степень ингибирования: 52,6%, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента). Таким образом, была подтверждена зависимость от дозы противоопухолевая активность (фиг. 28В).

Пример 26.

Анализ интервалов введения антитела Т6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480.

Затем, для того чтобы проанализировать оптимальные интервалы введения антитела Т6-16, исследовали противоопухолевую активность клона Т6-16 при его введении с интервалами введения один раз в неделю (один раз каждые 7 дней) и один раз каждые 10 дней в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid 6-недельного возраста. Через десять дней после трансплантации (день 10), когда средний объем опухолей достигал 100 мм^3 , мышей делили на группы: контрольную группу (IgG мыши, 10 мг/кг массы тела, N=8, $105,8 \pm 9,9 \text{ мм}^3$), группу введения антитела Т6-16 (один раз в неделю) (10 мг/кг массы тела, N=8, $105,0 \pm 11,6 \text{ мм}^3$) и группу введения антитела Т6-16 (один раз каждые 10 дней) (10 мг/кг массы тела, N=5, $130,8 \pm 2,4 \text{ мм}^3$). Затем начинали введение. На 43-й день объем опухолей в контрольной группе составлял $473,5 \pm 137,0 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела Т6-16 (один раз в неделю) составлял $243,7 \pm 65,3 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 48,5%, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и объем опухолей в группе введения антитела Т6-16 (один раз каждые 10 дней) составлял $297,8 \pm 54,4 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 37,1%, $P < 0,05$, t-критерий Стьюдента) (фиг. 29). Как известно из уровня техники (US 7420040 и US 7420041), в том случае, когда антитела вводили в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы (ВхРС-3) в дозе 20 мг/кг массы тела три раза в неделю (с интервалами введения в 2 дня), антитела проявляли противоопухолевую активность со степенью ингибирования от 50 до 60%. В отличие от этого, антитело Т6-16 проявляло значимую противоопухолевую активность при его введении в дозе, составляющей половину от дозы, используемой в известном уровне техники и с частотой один раз каждые 10 дней (с интервалами введения в 9 дней). Соответственно, стало ясно, что антитело Т6-16 проявляло значимую противоопухолевую активность в суммарной дозе, составляющей по меньшей мере 1/8 часть от дозы, используемой в известном уровне техники.

Пример 27.

Анализ противоопухолевой активности клона К5-70 в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли простаты человека DU-145.

Противоопухолевую активность клона К5-70 по отношению к злокачественной опухоли простаты человека оценивали в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием клеток DU-145 (банк клеток RIKEN, RCB2143). Клетки DU-145 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали каждой из самок мышей nude 6-недельного возраста (Balb/c, nu/nu). День, когда осуществляли трансплантацию, считали днем 1. Мышей делили на группы: контрольную группу (IgG мыши) (N=8) и группу введения

антитела K5-70 (N=8). Начиная с 1 дня антитело K-70 и контрольное антитело вводили мышам внутрибрюшинно с частотой один раз каждые 3 дня в дозе 10 мг/кг массы тела. На 40-й день объем опухолей в контрольной группе составлял $368,2 \pm 307,8$ мм³. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела K5-70 составлял $30,6 \pm 29,6$ мм³ ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует об активности в ингибировании образования опухолей, составляющей примерно 90% (фиг. 30А). Что касается массы опухолей, то наблюдали значимую противоопухолевую активность. Масса опухолей в контрольной группе на 40-й день составляла $0,18 \pm 0,18$ г. Напротив, в группе введения антитела K5-70 опухоли исчезали у всех 8 особей мышей, и, следовательно, образование опухолей было полностью ингибировано (фиг. 30В). На основании приведенных выше результатов стало очевидным, что моноклональное антитело против TROP-2 человека клона K5-70 проявляет сильную противоопухолевую активность даже по отношению к клеткам злокачественной опухоли простаты человека.

Пример 28.

Ингибирующая метастазы активность антитела K5-70 в модели метастазов печени с использованием линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59.

Метастазы злокачественных опухолей являются важным фактором, который влияет на клинический прогноз при лечении рака желудочно-кишечного тракта. Контроль метастазов является важной терапевтически значимой задачей. Если не только образование опухолей, но также и метастазы злокачественной опухоли в другие органы можно подавить при введении антитела, применяемого для терапии злокачественных опухолей, мишенью которого является TROP-2, то можно предполагать высокую клиническую ценность. Таким образом, такое свойство является желательным для терапевтического противоракового антитела.

Экспрессия TROP-2 была подтверждена во многих типах карцином. Сообщалось, что TROP-2, в частности, экспрессируется на высоком уровне в очагах метастазов (Br. J. Cancer (2008); 99: 1290-1295, Clin. Cancer Res. (2006); 12: 3057-3063, Mod. Pathol. (2008); 21: 186-191). Кроме того, также сообщалось, что в том случае, когда злокачественные клетки с введенным геном TROP-2 трансплантировали мышам nude посредством введения через селезенку или поджелудочную железу, частота метастазов печени возрастала (WO 2010/089782, Molecular Cancer (2010); 9: 253), и, следовательно, сообщение свидетельствует о важности TROP-2 в процессе образования метастазов злокачественных опухолей. Однако в настоящее время нет сообщений, специально описывающих что антитело, мишенью которого является TROP-2, оказывает ингибирующее метастазы действие *in vivo*.

Моноклональное анти-hTROP-2-антитело мыши K5-70, которое раскрыто в настоящем изобретении, оказывает высокое терапевтическое действие в моделях ксенотрансплантатов, полученных подкожной трансплантацией клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека. В анализе заращения царапины, осуществляемом *in vitro*, было показано, что антитело K5-70 способно подавлять способность линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59 к миграции в дополнение к эффекту подавления роста злокачественных клеток. Таким образом, было высказано предположение, что антитело K5-70 может ингибировать метастазы злокачественных опухолей *in vivo*. Поэтому исследовали ингибирующее метастазы действие мышинного моноклонального анти-hTROP-2-антитела, используя модели, в которых клетки PK-59 инъецировали в селезенку мышей nude, чтобы могли развиваться метастазы в печени.

За день до трансплантации злокачественных клеток мышей делили на группы. Затем мышам вводили внутрибрюшинно моноклональное анти-hTROP-2-антитело (K5-70) или контрольное антитело (очищенный IgG мыши) в дозе 10 мг/кг массы тела. На следующий день линию клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (PK-59), эндогенно экспрессирующих hTROP-2, собирали обработкой трипсином и затем готовили суспензию клеток в PBS в концентрации 2×10^7 клеток/мл. Суспензию клеток хранили на льду до трансплантации. Каждую из самок мышей nude (Balb/c, nu/nu) 6- или 7-недельного возраста анестезировали внутрибрюшинным введением пентобарбитала и под анестезией вырезали 10-15 мм из левого бока. Вынимали селезенку из брюшной полости и затем 50 мкл клеточной суспензии (1×10^6 клеток) инъецировали в селезенку, используя шприц 27G. Через 4 мин после инъекции клеток ворота селезенки зашивали шелковой хирургической нитью 5-0 и затем селезенку вырезали. Разрез брюшины зашивали шелковой хирургической нитью 4-0, и затем участок, на котором проводилась операция, закрывали, используя клипсы для ран (AUTOCLIP 9 мм, Vecton Dickinson). Кроме того, через семь дней после трансплантации злокачественных клеток мышам вводили антитело K-70 и контрольное антитело в дозе 10 мг/кг массы тела. Через 4-6 недель после трансплантации злокачественных клеток мышей подвергали эвтаназии цервикальной дислокацией. Затем вырезали печень из каждой мыши и проверяли наличие или отсутствие очагов метастазов.

В контрольной группе, в которой мышам вводили IgG мыши, у 4 из 6 мышей, которым трансплантировали клетки PK-59, наблюдали явные очаги метастазов (от 2 до 7 очагов) по всей доле печени через 4-6 недель после трансплантации (фиг. 31А, частота метастазов: 67%, табл. 6). Напротив, у четырех мышей в группе введения антитела K5-70, которым также были трансплантированы клетки PK-59, таких очагов метастазов в печени ни у одной мыши не наблюдали, и, следовательно, частота метастазов со-

ставляла 0% (фиг. 31В, табл. 6).

Таблица 6

Подавляющее метастазы действие клона K5-70 в моделях метастазов печени, полученных трансплантацией мышам nude через селезенку клеток РК-59

Группа введения	Недели после трансплантации	№ особи	Количество очагов метастазов	Определение метастазов
Контрольная группа	4 нед.	C-1	0	-
	4 нед.	C-2	5	++
	6 нед.	C-3	7	++
	6 нед.	C-4	7	++
	6 нед.	C-5	2	+
	6 нед.	C-6	0	-
Среднее количество очагов метастазов			3,5	Частота метастазов 67%
Группа введения K5-70	4 нед.	K-1	0	-
	6 нед.	K-2	0	-
	6 нед.	K-3	0	-
	6 нед.	K-4	0	-
Среднее количество очагов метастазов				Частота метастазов 0%

На основании полученных результатов стало очевидно, что анти-hTROP-2-антитело K5-70 оказывает чрезвычайно сильное ингибирующее действие на метастазы в печени линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-59.

Пример 29.

Противоопухолевая активность антитела K5-70 в моделях ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, которые представляют собой модели рецидивирующих злокачественных опухолей после введения гидрохлорида иринотекана.

В последние годы было разработано много химиотерапевтических лекарственных средств для подавления роста злокачественных клеток в качестве лекарственных средств для терапии злокачественных опухолей. С использованием таких лекарственных средств были достигнуты определенные результаты лечения. Однако такие химиотерапевтические лекарственные средства создают проблемы в отношении побочных эффектов, ассоциированных с их подавляющим рост действием на нормальные клетки, отличные от злокачественных клеток, и с рецидивами злокачественной опухоли после прекращения лечения.

Соответственно, если рецидивы опухолей после завершения лечения химиотерапевтическим лекарственным средством могут быть подавлены введением противоопухолевого терапевтического антитела, мишенью которого является TROP-2, то можно предположить высокую клиническую значимость такого антитела. Таким образом, такое свойство противоопухолевого терапевтического антитела является желательным.

В качестве терапевтического средства для лечения рака прямой и ободочной кишки в дополнение к 5-FU и содержащим платину лекарственным средствам недавно в клинике применили гидрохлорид иринотекана (топотедин, Daiichi Sankyo Co., Ltd.), обладающий ингибирующим топоизомеразу действием. Что касается моделей на животных, то сообщалось о противоопухолевом действии гидрохлорида иринотекана в мышинных моделях, в которых были трансплантированы различные типы опухолевых клеток человека, включая злокачественную опухоль ободочной кишки в качестве типичного примера (Cancer Chemother. Pharmacol. (1991); 28(3): 192-8). Поэтому было исследовано предотвращающее рецидивы действие анти-hTROP-2-антитела клона K5-70 (IgG2a мыши) на рекуррентную опухоль после введения гидрохлорида иринотекана в моделях ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок самкам мышей NOD-scid 8-недельного возраста. Через 11 дней после трансплантации (день 11), когда средний объем опухолей достигал 100 мм^3 , мышей делили на группы: группу без обработки (группа введения физиологического раствора, N=8, $130,7 \pm 16,2 \text{ мм}^3$) и группу введения гидрохлорида иринотекана (CPT-11, топотедин, Daiichi Sankyo Co., Ltd.) (N=16, $123,0 \pm 21,4 \text{ мм}^3$). Затем мышам внутрибрюшинно вводили гидрохлорид иринотекана в дозе 40 мг/кг массы тела один раз каждые 3 дня, всего 3 раза (дни 11, 14 и 17). На третий день после последнего введения гидрохлорида иринотекана (день 20) объем опухолей в необработанной группе достигал $232,1 \pm 21,1 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухолей в группе введения гидрохлорида иринотекана составлял $126,6 \pm 26,6 \text{ мм}^3$ ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и

следовательно, наблюдали явное подавляющее опухоли действие. На такой стадии группу введения гидрохлорида иринотекана делили на две группы на основе размера опухолей. Одну группу определяли как группу введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела, N=8, объем опухолей на 20 день: $126,0 \pm 28,0$ мм³), а другую группу определяли как группу введения IgG мыши (10 мг/кг массы тела, N=8, объем опухолей на 20 день: $127,2 \pm 27,0$ мм³). Внутривентриальное введение антител и измерение объема опухолей осуществляли в каждой группе один раз каждые 3 дня, так чтобы оценить рецидивы опухолей (фиг. 32). В группе введения IgG мыши, начиная с 18-ого дня после последнего введения гидрохлорида иринотекана (день 35), наблюдали явные рецидивирующие опухоли с объемом опухолей более 300 мм³. На 30-й день после последнего введения гидрохлорида иринотекана (день 47) опухоли с объемом опухолей более 300 мм³ наблюдали у 5 из 8 мышей (средний объем опухолей: $401,7 \pm 172,7$ мм³). Напротив, в группе введения антитела K5-70 рецидивы опухолей были значимо подавлены, и средний объем опухолей составлял $180,5 \pm 142,1$ мм³ ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента) (фиг. 32). В частности, в группе введения антитела K5-70 объем опухолей на 47-й день стал меньше, чем объем опухолей в тот момент, когда мышей делили на группы ($126,0 \pm 28,0$ мм³). Объем опухолей стал меньше 100 мм³ у 4 из 8 мышей. На основании полученных результатов стало очевидно, что анти-hTROP-2-антитело K5-70 оказывает чрезвычайно сильное подавляющее действие на рецидивирующие опухоли после введения гидрохлорида иринотекана.

Пример 30.

Картирование эпитопов с использованием методики CLIPS.

Материалы и способы.

Синтез пептидов.

15- и 30-мерные линейные пептиды, происходящие из внеклеточных доменов TROP-2, которые использовали в настоящем эксперименте, получали твердофазным синтезом согласно способу на основе Fmoc (9-флуоренилметоксикарбонил). Кроме того, для анализа прерывистых эпитопов синтезировали 17-мерные пептиды, происходящие из внеклеточного домена TROP-2, к обоим концам которого добавляли остатки цистеинов, и реконструировали конформацию, имеющую одну или две петлевые структуры, с использованием методики CLIPS (Chemically Linked Peptides on Scaffolds, методики получения химически связанных пептидов на каркасах). В том случае если другой остаток цистеина присутствовал вблизи добавляемого остатка цистеина, его заменяли аланином.

Скрининг эпитопов в ELISA 5034 типа синтезированных пептидов ковалентно связывали с картами PEPSCAN (455 пептидов/карту) и затем анализировали связывание синтезированных пептидов с антителами способом ELISA. Обеспечивали возможность взаимодействия карт PEPSCAN с моноклональными антителами против TROP-2 человека (K5-70, K5-107, K5-116-2-1, T5-86 и T6-16), которые были разбавлены до концентрации 1 мкг/мл блокирующим буфером (фосфатный буфер, содержащий 4% сыворотки, 5% овальбумина и 1% твина). После промывки полученному продукту давали возможность взаимодействовать с разбавленным в 1000 раз комплексом пероксидаза-второе антитело при 25°C в течение 1 ч. После промывки к реакционному раствору добавляли раствор субстрата (раствор, содержащий сульфат 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолина (ABTS) и 2 мкл 3% раствора пероксида водорода) с последующей хромогенной реакцией в течение 1 ч. Связывающую активность антител количественно оценивали, фотографируя CCD-камерой и затем осуществляя анализ изображений.

Результаты.

Моноклональные анти-hTROP-2-антитела K5-70, K5-107, K5-116-2-1, T5-86 и T6-16, которые оказывали полезное действие, подвергали эпитопному анализу с использованием методики CLIPS (методики химически связанных пептидов на каркасах). Необходимо отметить, что термин "номер аминокислоты" используют в настоящих примерах для обозначения номера аминокислоты в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2 (белок hTROP-2 (323 аминокислотных остатка)).

Результат анализа антитела K5-70 показан в табл. 7. В результате было обнаружено, что 33 пептида проявляют высокую активность в связывании с антителом K5-70. В указанных 33 пептидах многократно обнаруживали последовательность, содержащую VCSPDGGPGGRCQCRAIGSGMAVD (номера аминокислот 43-65) (пептиды № 1-7 и 9, показанные в табл. 7), последовательность, содержащую HHILIDLRRHPTAG (номера аминокислот 152-165) (пептиды № 14, 22-24 и 28, показанные в табл. 7), последовательность, содержащую VHYEQPTIQIELRQ (номера аминокислот 193-206) (пептиды № 8, 10, 12, 13, 18, 20, 21, 23, 26, 28, 30 и 32, показанные в табл. 7), и последовательность, содержащую DLDAELRRLFRER (номера аминокислот 171-183) (пептиды № 11, 16, 18, 19, 21, 22, 29 и 31, показанные в табл. 7). В частности, антитело K5-70 сильно связывалось с последовательностью, содержащей VCSPDGGPGGRCQCRAIGSGMAVD.

На основании полученных результатов было высказано предположение, что в белке hTROP-2 указанные выше четыре типа областей последовательностей пептидов, вероятно, являются эпитопами антитела K5-70.

Таблица 7

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

Номер	Пептид	Связывание с K5-70
1	NKMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDCST	2742
2	TVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTS	2604
3	TNKMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	2562
4	MTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT	2402
5	KMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTL	1770
6	PTNNKMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDC	1391
7	VCSPD GPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK	932
8	CAAVHYEQPTIQIELRCAAVHYEQPTIQIELRC	876
9	CPTNKMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVD	839
10	CVHYEQPTIQIELRQNCVHYEQPTIQIELRQNC	825
11	HSDLD AELRR LFRERCHSDLD AELRR LFRERC	725
12	RLFRRYRLHPKFVA AVHYEQPTIQIELRQ	687
13	AVHYEQPTIQIELRQ	642
14	CAGAFNHS DLD AELRR CHHILDLRHRPTAGAC	624
15	CPKFVA AVHYEQPTIQCGDLRVRGEPLQVERC	579
16	CHSDLD AELRR LFRERCGDLRV	538
17	FQGRGGLDLRVRGEP	538
18	CVHYEQPTIQIELRQNC DLD AELRR LFRERYRC	524
19	CHSDLD AELRR LFRERCRGEPLQ	519
20	CTIQIELRQNTSQKACVHYEQPTIQIELRQNC	513
21	CVHYEQPTIQIELRQNC HSDLD AELRR LFRERC	511
22	CHHILDLRHRPTAGACHSDLD AELRR LFRERC	489
23	CHHILDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	489
24	CHHILDLRHRPTAGACGLDLRVRGEPLQVERC	488
25	CDAELRR LFRERYRLHCDELVRTHHILDLRHC	483
26	CVHYEQPTIQIELRQNC	483
27	CAFNHS DLD AELRR LFCVHYEQPTIQIELRQNC	478
28	CVHYEQPTIQIELRQNC HHILDLRHRPTAGAC	473
29	CDAELRR LFRERYRLHCDELVRTHHILDLRHC	472
30	VHYEQPTIQIELRQNCGLDLRVRGEPLQVERC	470
31	CDELVRTHHILDLRHC DLD AELRR LFRERC	469
32	AVHYEQPTIQIELRQCAVHYEQPTIQIELRQC	468
33	CHSDLD AELRR LFRERCDELVRTHHILDLRHC	466

Результат анализа антитела K5-107 показан в табл. 8. В результате было обнаружено, что последовательность, содержащая VCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVD (номера аминокислот 43-65) входила в состав 10 из 20 пептидов (пептиды № 1-6, 8, 9, 14 и 17, показанные в табл. 8).

Соответственно, были получены свидетельства того, что в белке hTROP-2 указанная выше область пептидной последовательности, состоящая из VCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVD, может быть эпитопом антитела K5-107.

Таблица 8

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

Номер	Пептид	Связывание с K5-107
1	TNKMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	2763
2	NKMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDCST	2761
3	KMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTL	2752
4	MTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLT	2726
5	CPTNKMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVD	2723
6	TVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTS	2720
7	TCPTNKMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAV	2716
8	VCSPD GPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK	2689
9	CSPD GPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSK	2655
10	CTCPTNKMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMA	2655
11	NCTCPTNKMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGM	2207
12	DNCTCPTNKMTVCS PDGPGGRCQCRALGSG	1816
13	TNKMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDCS	1525
14	CTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDASTLTSKC	1118
15	QDNCTCPTNKMTVCS PDGPGGRCQCRALGS	874
16	SPD GPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKCL	561
17	CTNKMTVCS PDGPGGRCQCRALGSGMAVDASTC	380
18	TVCS PDGPGGRCQCR	312
19	CAPKNARTLVRPSEHACARTLVRPSEHALVDNC	284
20	HSDLD AELRR LFRERCHSDLD AELRR LFRERC	272

Результат анализа антитела K5-116-2-1 показан в табл. 9. В данном анализе три типа пептидных последовательностей, а именно, последовательность, содержащая VCSPDGGGRCQCRA LGSGMAVD (номера аминокислот 43-65) (пептиды № 1-7, 15 и 25, показанные в табл. 9), последовательность, содержащая HHILIDLRHRPTAG (номера аминокислот 152-165) (пептиды № 8-11, 16, 17, 19, 20, 22-24 и 27-29, показанные в табл. 9), и последовательность, содержащая DLDAELRRLFRER (номера аминокислот 171-183) (пептиды № 11-14, 17, 19, 21, 23 и 29, показанные в табл. 9), встречались несколько раз (табл. 9). Соответственно, были получены свидетельства того, что в белке hTROP-2 три указанных типа областей пептидной последовательности могут быть эпитопами антитела K5-116-2-1.

Таблица 9

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

Номер	Пептид	Связывание с K5-116-2-1
1	TVSPDGGGRCQCRA LGSGMAVDCSTLS	2672
2	NKMTVSPDGGGRCQCRA LGSGMAVDCST	2613
3	TNKMTVSPDGGGRCQCRA LGSGMAVDCS	2482
4	MTVSPDGGGRCQCRA LGSGMAVDCSTLT	2440
5	KMTVSPDGGGRCQCRA LGSGMAVDCSTL	2423
6	CPTNKMTVSPDGGGRCQCRA LGSGMAVD	2136
7	PTNKMTVSPDGGGRCQCRA LGSGMAVDC	1723
8	CAGAFNHSDLDALRCHHILIDLRHRPTAGAC	1643
9	CTHHILIDLRHRPTAGC	1586
10	CVHYEQPTIQIELRQNC HHILIDLRHRPTAGAC	1504
11	CHHILIDLRHRPTAGCHSDLDALRRLFRERC	1475
12	HSDLDALRRLFRERCHSDLDALRRLFRERC	1467
13	CDAELRRLFRERYRLHCHSDLDALRRLFRERC	1462
14	CDAELRRLFRERYRLHCPK	1442
15	VCSPDGGGRCQCRA LGSGMAVDCSTLTSK	1432
16	DLSLRCELVTRTHHILIDLRHRPTAGAFNH	1421
17	CDELVRTHHILIDLRHCDLDAELRRLFRERYRC	1392
18	CFQGRGGLDLRVRGEPK	1376
19	CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC	1366
20	CGLDLRVRGEPLQVERCHHILIDLRHRPTAGAC	1342
21	CHSDLDALRRLFRERCHSDLDALRRLFRERC	1331
22	CDELVRTHHILIDLRHCHHILIDLRHRPTAGAC	1323
23	CDAELRRLFRERYRLHCDELVRTHHILIDLRHC	1266
24	CHHILIDLRHRPTAGACRGEPLQVERTLIYYLC	1229
25	CSPDGGGRCQCRA	1227
26	CTVASPDGGGRCQCRA CVHYEQPTIQIELRQNC	1223
27	CHHILIDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	1222
28	LSLRCELVTRTHHILIDLRHRPTAGAFNHS	1220
29	CDELVRTHHILIDLRHCHSDLDALRRLFRERC	1205

Результаты анализа антител T5-86 и T6-16 показаны в табл. 10 и 11 ниже соответственно. В указанных анализах антитела сильно связывались с пептидом, содержащим последовательность, состоящую из DPEGRFKARQCN (номера аминокислот 109-120). Указанная выше пептидная последовательность входила в состав 22 из 26 пептидов, связывающихся с антителом T5-86 (пептиды № 1-4, 6-8, 10-13, 15-19 и 21-26, показанные в табл. 10), и она входила в состав 4 из 26 пептидов, связывающихся с антителом T6-16 (пептиды № 1, 2, 9 и 13, показанные в табл. 11). Кроме того, в анализе, относящемся к антителу T5-86, несколько раз встречалась другая последовательность, отличная от последовательности, содержащей DPEGRFKARQCN (номера аминокислот 109-120), а именно, последовательность, содержащая VCSPDGGGRCQCRA (номера аминокислот 43-57) (пептиды № 5, 14 и 20, показанные в табл. 10). Кроме того, в анализе, относящемся к антителу T6-16, несколько раз обнаруживали другую последовательность, содержащую HHILIDLRHRPTAG (номера аминокислот 152-165) (пептиды № 4-8, 10-12, 19, 21, 23, 25 и 26, показанные в табл. 11). Соответственно, было получено свидетельство того, что в белке hTROP-2 два типа областей пептидной последовательности, а именно, DPEGRFKARQCN (номера аминокислот 109-120) и VCSPDGGGRCQCRA (номера аминокислот 43-57), могут быть эпитопами антитела K5-86. Также было получено свидетельство того, что в белке hTROP-2 два типа областей пептидной последовательности, а именно, DPEGRFKARQCN (номера аминокислот 109-120) и HHILIDLRHRPTAG (номера аминокислот 152-165), могут быть эпитопами антитела T6-16.

Связывание антитела Т5-86 с CLIPS-пептидами, происходящими из внеклеточных доменов TROP-2 человека

Номер	Пептид	Связывание с Т5-86
1	CYDPDADPEGRFKARQCADPEGRFKARQANQTC	2306
2	PDCEPGRFKARQCN	2292
3	CADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC	2287
4	VCPDGGPGRQCQRA	2263
5	CYDPDADPEGRFKARQCPDADPEGRFKARQANC	2260
6	CADPEGRFKARQANQCTDADPEGRFKARQC	2240
7	CADPEGRFKARQANQTCYDPDADPEGRFKARQC	2208
8	DCDPEGRFKARQCNQ	2150
9	CTVASPDGPGGQAQARCHSDLAELRRLLFRERC	2086
10	CDADPEGRFKARQANQCADPEGRFKARQANC	2035
11	DGRFKARQANQTSVAWCARTLVRPSEHALVDNC	2019
12	DADPEGRFKARQANQTCPDADPEGRFKARQANC	1980
13	CPDADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC	1950
14	CSPDGGPGRQCQCAL	1946
15	CEGRFKARQANQTSVACEGRFKARQANQTSVAC	1895
16	CTVASPDGPGGQAQARCPDADPEGRFKARQANC	1890
17	CGLYDPDADPEGRFKACPDADPEGRFKARQANC	1857
18	DPDCEPGRFKARQCNQTSVCWCVNSVGVV	1850
19	CPEGRFKARQANQTSVCDELVRHHILDLRHC	1841
20	CPDGGGQAQARALGCHSDLAELRRLLFRERC	1830
21	CTLVRPSEHALVDNDGCGRFRFKARQANQTSVAWC	1820
22	CPDADPEGRFKARQANCYDPDADPEGRFKARQC	1795
23	CGLYDPDADPEGRFKACPEGRFKARQANQTSVC	1793
24	YDPDCEPGRFKARQ	1775
25	CPDADPEGRFKARQANCADPEGRFKARQANQTC	1773
26	CDPEGRFKARQCNQTC	1772

Таблица 11

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

Номер	Пептид	Связывание с Т6-16
1	CVNSVGVVRRTDKGDLSLPCDADPEGRFKARQC	1072
2	CSVGVVRRTDKGDLSLRCYDPDADPEGRFKARQC	786
3	HSDLDAELRRLLFRERCHSDLAELRRLLFRERC	714
4	CDELVRTHHILIDLRCDELVRTHHILIDLRC	713
5	CVNSVGVVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILI	688
6	VVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILIDLRRHP	670
7	CVERTLIYYLDEIPPKCHHILIDLRRHPAGAC	626
8	CHHILIDLRRHPAGACVNSVGVVRRTDKGDLSLRC	620
9	CVNSVGVVRRTDKGDLSLPCDADPEGRFKARQANC	611
10	CVHYEQPTIQIELRQNCVNSVGVVRRTDKGDLSLRC	602
11	VGVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILIDLRC	601
12	CAGAFNHSDLAELRRCHHILIDLRRHPAGAC	592
13	CSVGVVRRTDKGDLSLRCYDPDADPEGRFKARQANC	585
14	CVRPSEHALVDNDGLYCVNSVGVVRRTDKGDLSLRC	573
15	CDAELRRLLFRERYRCHSDLAELRRLLFRERC	566
16	CSVGVVRRTDKGDLSLRCNDGLYDPDADPEGRFC	559
17	CVNSVGVVRRTDKGDLSLPCDADPEGRFKAC	553
18	CDLDAELRRLLFRERYRCHSDLAELRRLLFRERC	534
19	CDELVRTHHILIDLRCCHHILIDLRRHPAGAC	534
20	CAGAFNHSDLAELRRCHHILIDLRRHPAGAC	529
21	CDAELRRLLFRERYRCHDELVRTHHILIDLRC	527
22	CVHYEQPTIQIELRQNCDELDAELRRLLFRERYRCH	526
23	CHHILIDLRRHPAGACVHYEQPTIQIELRQNC	524
24	CGVRRTDKGDLSLRCVRRTDKGDLSLRC	524
25	CGLDLRVRGEPLQVERCHHILIDLRRHPAGAC	521
26	CDLDAELRRLLFRERYRCHDELVRTHHILIDLRC	516

Пример 31.

Секвенирование переменных областей генов антител для анти-hTROP-2-антител мыши (клоны K5-70, K5-107, K5-116-2-1 и T6-16).

Суммарную РНК экстрагировали из 3×10^6 гибридом, продуцирующих моноклональные мышиные анти-TROP-2-антитела, используя реагент триазол (Invitrogen). Что касается клон K5-70, клон K5-107 и клон K5-116-2-1, то кДНК синтезировали, используя набор для амплификации кДНК SMARTer™ RACE (Clontech), согласно способу, описание которого прилагается к набору, используя праймер, специфичный

для Н-цепи IgG мыши (5'-ТССАКАГТТССА-3' (SEQ ID NO:24)), и праймер, специфичный для L-цепи IgG мыши (5'-GCTGTCCTGATC-3' (SEQ ID NO:25)). Что касается клона Т6-16, то кДНК синтезировали, используя набор GeneRacer (Invitrogen), согласно способу, описание которого прилагается к набору, используя олиго-dT-праймер. Каждый из генов, кодирующих переменные 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, используя синтезированную, как описано выше, кДНК в качестве матрицы. В данном способе 10х смесь универсальных праймеров А (UPM), включенную в набор для амплификации кДНК SMARTer™ RACE, использовали в качестве 5'-праймера. С другой стороны, в качестве 3'-праймера для амплификации VH использовали праймер, имеющий последовательность, специфичную для Н-цепи IgG мыши, а в качестве 3'-праймера для амплификации VL использовали праймер, имеющий последовательность, специфичную для L-цепи IgG мыши.

5'-Праймер (10х смесь универсальных праймеров А (UPM)):

Длинный (0,4 мкМ).

5'-СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГСААГСАГТГГТАТСААСГАГАГТ-3' (SEQ ID NO: 26):

Короткий (2 мкМ).

5'-СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГСА-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'-CACTGCCATCAATVCTCCACTTGACA-3' (SEQ ID NO: 30).

Используя каждый из описанных выше праймеров, осуществляли ПЦР с использованием следующего состава реакционного раствора и условий реакции. Кроме того, R-праймер для амплификации кДНК VH получали смешиванием двух указанных выше последовательностей друг с другом в эквимольном соотношении и затем использовали.

Состав реакционного раствора

Матричная кДНК:	2,5 мкл
5 × буфер PrimeSTAR (Mg ²⁺ плюс):	10 мкл
2,5 мм dNTP:	4 мкл
ДНК-полимераза PrimeSTAR HS (2,5 ед./мкл):	0,5 мкл
10 × смесь универсальных праймеров А (UPM):	5 мкл
R-праймер (10 мкМ):	1 мкл
<u>Стерилизованная вода:</u>	<u>27 мкл</u>
Всего:	50 мкл

Условия реакции.

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

Синтезированные кДНК VH и VL субклонировали в векторе pMD20-T (Takara Bio Inc.) и определяли нуклеотидные последовательности. Нуклеотидные последовательности множества клонов VH и клонов VL расшифровывали и идентифицировали нуклеотидные последовательности, специфичные для переменных областей Н-цепи и L-цепи мыши. На фиг. 33 и 34 показаны консенсусные нуклеотидные последовательности кДНК VH и VL K5-70 и предполагаемые аминокислотные последовательности. На фиг. 35 и 36 показаны консенсусные нуклеотидные последовательности кДНК VH и VL K5-107 и предполагаемые аминокислотные последовательности. На фиг. 37 и 38 показаны консенсусные нуклеотидные последовательности кДНК VH и VL K5-116-2-1 и предполагаемые аминокислотные последовательности.

Гены, кодирующие переменные области (VH, VL) Н- и L-цепей клона Т6-16, клонировали способом ПЦР, используя синтезированную, как описано выше, кДНК в качестве матрицы. В данном способе 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 для Н-цепи IgG мыши, и в качестве 3'-праймера для амплификации VL использовали праймер, имеющий последовательность, специфичную для 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)

Используя каждый из описанных выше праймеров, осуществляли ПЦР с использованием следующего состава реакционного раствора и условий реакции.

Состав реакционного раствора.

Матричная кДНК:	1,0 мкл
5 × буфер PrimeSTAR (Mg ²⁺ плюс):	10 мкл
2,5 мм dNTP:	4 мкл
ДНК-полимераза PrimeSTAR HS (2,5 ед./мкл):	0,5 мкл
F-праймер (10 мкМ):	3 мкл
R-праймер (10 мкМ):	1,0 мкл
<u>Стерилизованная вода:</u>	<u>30,5 мкл</u>
Всего:	50 мкл

Условия реакции.

Осуществляли цикл, состоящий из "тепловой денатурации/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 векторе pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) и определяли их нуклеотидные последовательности. Нуклеотидные последовательности множества клонов VH и клонов VL расшифровывали и идентифицировали нуклеотидные последовательности, специфичные для переменных областей H-цепи и L-цепи мыши. На фиг. 39 и 40 показаны консенсусные нуклеотидные последовательности кДНК VH и VL T6-16 и предполагаемые аминокислотные последовательности.

Пример 32.

Конструирование гуманизированного антитела K5-70.

Гуманизацию переменных областей (VH, VL) антитела K5-70, полученных, как описано в предыдущих примерах, осуществляли следующим образом согласно способу Queen с соавторами (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033, 1989). Сначала осуществляли молекулярное моделирование трехмерной структуры каждой переменной области антитела K5-70, используя компьютер. Затем проводили поиск гомологии с последовательностями переменных областей генов антител человека. В результате последовательность кДНК (DA980102 VH) с номером доступа в GenBank DA980102 была выбрана в качестве акцептора, который обеспечивает каркасную область (FR), необходимую для гуманизации VH K5-70 (Genome Res. 16: 55-65, 2006). Подобным образом последовательность кДНК (L41174 VL) с номером доступа в GenBank L41174 была выбрана в качестве акцептора, который обеспечивает каркасную область (FR), необходимую для гуманизации VL K5-70 (J. Biol. Chem. 270: 12457-12465, 1995).

Для гуманизации VH K5-70 последовательность CDR VH K5-70 заменяли соответствующим положением VH DA980102, используемой в качестве акцептора. В результате анализа трехмерной структуры согласно компьютерному моделированию, проводимого в отношении аминокислотных остатков (изолейцина (I) в положении 48, лизина (K) в положении 66, аланина (A) в положении 67, валина (V) в положении 71 и треонина (T) в положении 93), которые располагаются рядом с CDR VH K5-70 и которые, как полагают, играют важные роли в поддержании структуры, такие остатки в VH K5-70 сохраняли, а остальную FR-область заменяли акцепторной последовательностью. Номера положений аминокислотных остатков в VH и VL использовали согласно определениям Rabat с соавторами (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991).

Кроме того, метионин (M) в качестве аминокислотного остатка в положении 82 акцепторной последовательности VH DA980102 с большой вероятностью является специальным аминокислотным остатком, вызванным соматическим гипермутированием. Таким образом, чтобы снизить потенциальную антигенность, указанный выше метионин заменяли лейцином (L), который наиболее распространен в качестве аминокислотного остатка в положении 82. Выравнивание аминокислотных последовательностей сконструированной таким образом гуманизированной VH K5-70 (HuK5-70 VH), VH K5-70 и VH DA980102 показано на фиг. 41.

Что касается конструирования гуманизированной VL K5-70, то осуществляли такую же трансплантацию последовательности CDR, как описано выше. В качестве аминокислотного остатка (лизин (K) в положении 49), важного для поддержания структуры CDR, такой остаток VL K5-70 сохраняли, а остальную FR-область заменяли акцепторной последовательностью (HuK5-70 VL). Выравнивание аминокислотных последовательностей VL HuK5-70, VL K5-70 и VL L41174 показано на фиг. 42.

Пример 33.

Конструирование гуманизированного антитела T6-16.

Гуманизация переменных областей (VH, VL) антитела T6-16, полученного, как описано в предыдущих примерах, осуществляли следующим образом согласно способу Queen с соавторами (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033, 1989). Сначала осуществляли молекулярное моделирование трехмерной структуры каждой переменной области антитела T6-16, используя компьютер. Затем проводили поиск гомологии с последовательностями переменных областей генов антител человека. В результате последовательность кДНК (DA935238 VH) с номером доступа в GenBank DA935238 была выбрана в качестве акцептора, который обеспечивает каркасную область (FR), необходимую для гуманизации VH T6-16

(Genome Res. 16: 55-65, 2006). Подобным образом последовательность κДНК (M99608 VL) с номером доступа в GenBank M99608 была выбрана в качестве акцептора, который обеспечивает каркасную область (FR), необходимую для гуманизации VL T6-16 (J. Immunol. 149: 2518-2529, 1992).

Для гуманизации VH T6-16 последовательность CDR VH T6-16 заменяли соответствующим положением VH DA935238, используемой в качестве акцептора. В результате анализа трехмерной структуры согласно компьютерному моделированию, проводимого в отношении аминокислотных остатков (изолейцина (I) в положении 48, аланина (A) в положении 67 и лизина (K) в положении 73), которые располагаются рядом с CDR VH T6-16 и которые, как полагают, играют важные роли в поддержании структуры, такие остатки в VH T6-16 сохраняли, а остальную FR-область заменяли акцепторной последовательностью (HuT6-16 VH1). Кроме того, остаток лизина (K) в положении 73, вероятно, не оказывает влияния на соответствующее образование антигенсвязывающего участка, и поэтому отдельно конструировали аминокислотную последовательность, в которой остаток лизина VH1 HuT6-16 заменяли треонином (T), как более часто встречающимся аминокислотным остатком (HuT6-16 VH2). Выравнивание аминокислотных последовательностей сконструированной таким образом гуманизированной VH T6-16 (HuT6-16 VH1 и HuT6-16 VH2), VH T6-16 и VH DA935238 показано на фиг. 43.

Что касается конструирования гуманизированной VL T6-16, то осуществляли такую же трансплантацию последовательности CDR, как описано выше. Аминокислотные остатки, важные для поддержания структуры CDR, также сохраняли в акцепторной последовательности, и в качестве последовательности FR использовали такую же последовательность, как и последовательность акцептора (HuT6-16 VL). Выравнивание аминокислотных последовательностей VL HuT6-16, VL T6-16 и VL L41174 показаны на фиг. 44.

Пример 34.

Синтез генов гуманизированных VH и VL K5-70.

Гены, кодирующие VH HuK5-70 и VL HuK5-70, получали следующим образом. Гены синтезировали на основе аминокислотной последовательности, в которой последовательность сигнального пептида, полученная из VH или VL K5-70, была добавлена с N-концевой стороны каждой из сконструированных, как описано выше, VH и VL HuK5-70 (Operon). При выполнении указанного способа синтеза генов последовательность Козака (ACC ACC) добавляли с 5'-концевой стороны от последовательности гена каждой из синтезируемых VH HuK5-70 и VL HuK5-70. Кроме того, добавляли сайт EcoRI (GAA TTC) в качестве сайта фермента рестрикции к 5'-концу VH HuK5-70 и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к его 3'-концу. Подобным образом, сайт AgeI (ACC GGT) добавляли в качестве сайта фермента рестрикции к 5'-концу VL HuK5-70 и сайт BsiWI (CGT ACG) добавляли к его 3'-концу. Синтезированный ген VH HuK5-70 и ген VL HuK5-70 включали в вектор pCR2.1 (Invitrogen) согласно ТА-клонированию. Последовательности генов VH и VL HuK5-70, полученные в результате синтеза генов, показаны на фиг. 45 и 46 соответственно.

Пример 35.

Синтез гуманизированных генов VH1 T6-16, VH2 T6-16 и VL T6-16.

Гены, кодирующие VH1 HuT6-16, VH2 HuT6-16 и VL HuT6-16, получали следующим образом. Гены синтезировали на основе аминокислотной последовательности, в которой последовательность сигнального пептида, полученная из VH T6-16, была добавлена с N-концевой стороны от каждой из сконструированных, как описано выше VH1 HuT6-16 и VH2 HuT6-16, и аминокислотной последовательности, в которой последовательность сигнального пептида, полученная из VL T6-16, была добавлена с N-концевой стороны VL HuT6-16 (Operon). При выполнении указанного способа синтеза генов последовательность Козака (ACC ACC) добавляли с 5'-концевой стороны от последовательности гена каждой из синтезируемых VH1 HuT6-16 и VH2 HuT6-16 и VL HuT6-16. Кроме того, добавляли сайт EcoRI (GAA TTC) в качестве сайта фермента рестрикции к 5'-концу каждого из VH1 HuT6-16 и VH2 HuT6-16 и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к их 3'-концу. Подобным образом, сайт AgeI (ACC GGT) добавляли в качестве сайта фермента рестрикции к 5'-концу гуманизированного VL T6-16 и сайт BsiWI (CGT ACG) добавляли к его 3'-концу. Синтезированный ген VH1 HuT6-16, ген VH2 HuT6-16 и ген VL HuT6-16 включали в вектор pCR2.1 (Invitrogen) согласно ТА-клонированию.

Последовательности генов VH1 HuT6-16, VH2 HuT6-16 и VL HuT6-16, полученные в результате синтеза генов, показаны на фиг. 47-49 соответственно.

Пример 36.

Конструирование экспрессирующих гены векторов для гуманизированных генов VH и VL K5-70.

Гены VH и VL HuK5-70, каждый из которых был включен в вектор pCR2.1 (Invitrogen), расщепляли ферментами рестрикции EcoRI и NheI и AgeI и BsiWI соответственно, затем фрагменты генов извлекали. Затем отщепленный ген VH HuK5-70 встраивали в EcoRI/NheI-сайт вектора pFUSE-CHIg-hG1 (InvivoGen) в качестве вектора экспрессии клеток животных для экспрессии формы IgG1 человека (pFUSE-CHIg-HuK5-70), тогда как ген VL HuK5-70 встраивали в AgeI/BsiWI-сайт вектора pFUSE2-CLIg-hk (InvivoGen) в качестве вектора экспрессии формы Igκ человека (pFUSE2-CLIg-HuK5-70). Таким образом получали каждую из конструкций.

Пример 37.

Конструирование экспрессирующих генов векторов для гуманизированных генов VH1 T6-16, VH2 T6-16 и VL T6-16.

Гены VH1 T6-16 и VH2 T6-16, каждый из которых был включен в вектор pCR2.1 (Invitrogen), отщепляли ферментами рестрикции EcoRI и NheI и ген VL T6-16 отщепляли ферментами рестрикции AgeI и BsiWI. Затем генные фрагменты извлекали. Затем отщепленный ген VH1 T6-16 встраивали в EcoRI/NheI-сайт вектора pFUSE-CHlg-hG1 (InvivoGen) (pFUSE-CHlg-HuT6-16-1), и ген VH2 T6-16 также встраивали в EcoRI/NheI-сайт вектора pFUSE-CHlg-hG1 (pFUSE-CHlg-HuT6-16-2). Ген VL T6-16 встраивали в AgeI/BsiWI-сайт вектора pFUSE2-CLlg-hk (InvivoGen) (pFUSE2-CLlg-HuT6-16). Таким образом получали каждую из конструкций.

Пример 38.

Получение линии клеток 293F, способной стабильно экспрессировать антитело HuK5-70, антитело HuT6-16-1 и антитело HuT6-16-2.

Клетки 293F (Invitrogen) поддерживали и культивировали в среде для экспрессии Freestyle 293 (Invitrogen). Гены вводили в клетки 293F, используя реагент фектин 293 (Invitrogen), согласно протоколам, прилагаемым к набору. То есть, pFUSE-CHlg-HuK5-70 и pFUSE2-CLlg-HuK5-70 вводили в клетки 293F и затем осуществляли селекцию на лекарственном средстве, используя зеоцин (InvivoGen) и бластицидин (InvivoGen), с тем, чтобы получить линию клеток, способную экспрессировать антитело HuK5-70. Также pFUSE-CHlg-HuT6-16-1 и pFUSE2-CLlg-HuT6-16 вводили в клетки 293F и затем проводили селекцию на указанных выше лекарственных средствах с тем, чтобы получить линию клеток, способных стабильно экспрессировать антитело HuT6-16-1. Также pFUSE-CHlg-HuT6-16-2 и pFUSE2-CLlg-HuT6-16 вводили в клетки 293F и затем проводили селекцию на указанных выше лекарственных средствах с тем, чтобы получить линию клеток, способных стабильно экспрессировать антитело HuT6-16-2.

Пример 39

Очистка белков антитела HuK5-70, антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2

Каждую из полученных линий клеток, экспрессирующих антитела, инокулировали в среду для экспрессии Freestyle 293 (Invitrogen) при плотности клеток $1-2,5 \times 10^5$ клеток/мл и затем осуществляли культивирование во вращающихся флаконах в течение 6-8 дней. Затем извлекали надосады культуры и затем каждое из гуманизированных антител очищали, используя колонки с рекомбинантным белком А-сефарозой Fast Flow (GE Healthcare), согласно обычному способу.

На фиг. 50 показаны результаты, полученные при подтверждении с использованием Вестерн-блоттинга экспрессии каждого белка гуманизированного антитела в надосады культуры клеток 293F, в которых экспрессировались антитело HuK5-70, антитело HuT6-16-1 и антитело HuT6-16-2. В частности, после осуществления электрофореза в SDS-ПААГ каждый белок переносили на PVDF-мембрану (Immobilon-P, Millipore, IPVH00010). Мембрану блокировали при комнатной температуре в течение 30 мин с использованием буфера TBS (забуференный трисом физиологический раствор), содержащего 5% обезжиренное молоко. Полученный продукт промывали 0,1% TBST (TBS, содержащий 0,1% твина 20) в течение 5 мин три раза и затем давали возможность взаимодействовать с первым антителом.

На дорожке 1 показан надосады культуры клеток 293F, в которые не было введено генов (негативный контроль), и дорожка 2 показывает надосады культуры клеток 293F, в которые были введены pFUSE-CHlg-HuK5-70 и pFUSE2-CLlg-HuK5-70. Для выявления белков тяжелой цепи и легкой цепи антитела HuK5-70 использовали меченное биотином антитело против F(ab')₂ IgG человека (Rockland). На дорожке 3 показан надосады культуры клеток 293F, в которые были введены pFUSE-CHlg-HuT6-16-1 и pFUSE2-CLlg-HuT6-16, и дорожка 4 показывает надосады культуры клеток 293F, в которые были введены pFUSE-CHlg-HuT6-16-2 и pFUSE2-CLlg-HuT6-16. Белки тяжелой цепи антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 выявляли с использованием меченного биотином антитела против Fc IgG человека (Rockland), тогда как белки легкой цепи антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 выявляли с использованием меченного биотином антитела против F(ab')₂ IgG человека (Rockland).

В результате в случае антитела HuK5-70, антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 экспрессию белков тяжелой цепи и легкой цепи подтверждали в каждом надосады культуры.

Кроме того, на фиг. 51 показаны результаты, полученные при загрузке очищенного антитела HuK5-70, антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 на SDS-ПААГ и затем окрашивании их СВВ. Во всех случаях тяжелая цепь с молекулярной массой примерно 50 кДа и легкая цепь с молекулярной массой примерно 25 кДа были выявлены в восстанавливающих условиях, и полосы были подтверждены в таких же положениях, как и в случае тяжелой цепи и легкой цепи, выявленных описанным выше Вестерн-блоттингом. На основании полученных результатов было подтверждено, что были образованы белок антитела HuK5-70, белок антитела HuT6-16-1 и белок антитела HuT6-16-2.

Пример 40.

Аффинность гуманизированного антитела K5-70 (HuK5-70) и гуманизированных антител T6-16 (HuT6-16-1 и HuT6-16-2) по отношению к антигену.

Аффинность по отношению к антигену очищенного антитела HuK5-70, антитела HuT6-16-1 и анти-

тела HuT6-16-2 исследовали способами с использованием FACS и ELISA.

FACS осуществляли, используя клетки HEK293-hTROP-2, в которых полноразмерный ген TROP-2 человека стабильно экспрессировался в клетках HEK293, линию клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы PK-59, которые эндогенно экспрессировали белок TROP-2 человека на клеточной поверхности. 100 мкл раствора антитела, используемого в качестве первого антитела, которое было разбавлено до 1 мкг/мл средой, содержащей 10% FCS, добавляли к суспензии (5×10^5 клеток) клеток (клетки HEK293-hTROP-2 или клетки PK-59), которые были извлечены из культуральной чашки обработкой трипсином, и затем полученную смесь инкубировали при 4°C в течение 20 мин. Затем промывали 1 мл среды, содержащей 10% FCS. Затем к полученной смеси добавляли второе антитело (по 100 мкл), которое представляло собой меченное фикоэритрином (PE)-меченое антитело против IgG мыши (BD Pharmingen) или меченное биотином антитело против Fc IgG человека (Rockland), разбавленное до 200 раз или 2000 раз соответственно. Полученную смесь инкубировали при 4°C в течение 20 мин и затем снова промывали 1 мл среды, содержащей 10% FCS. В том случае, когда в качестве второго антитела использовали меченное биотином антитело против Fc IgG человека, 100 мкл раствора для мечения, в котором меченный стрептавидином PE (BD Pharmingen) был разбавлен до 400 раз, добавляли в качестве флуоресцирующего реагента для мечения. Затем полученную смесь инкубировали при 4°C в течение 20 мин и затем промывали 1 мл среды, содержащей 10% FCS. Затем образец, содержащий меченные клетки, суспендировали в 1 мл PBS, содержащего 1% FCS и 2 мм EDTA, и затем полученную суспензию анализировали, используя FACSCalibur (Becton Dickinson). В результате было обнаружено, что антитело HuK5-70 проявляло реактивность, эквивалентную реактивности мышинового антитела K5-70, как в клетках HEK293-hTROP-2, так и в клетках PK-59. Подобным образом, антитело HuT6-16-1 и антитело HuT6-16-2 проявляли реактивность, эквивалентную реактивности антитела T6-16 (фиг. 52).

Кроме того, также исследовали аффинность по отношению к антигену способом ELISA. ELISA осуществляли, используя планшет для ELISA, который покрывали рекомбинантным белком внеклеточной области hTROP-2, как описано в примере 3. В частности, 96-луночный планшет (BD FALCON) покрывали 50 мкл/лунку рекомбинантного белка внеклеточной области hTROP-2, который был разбавлен в PBS до 0,5 мкг/мл (при 4°C в течение ночи). Затем полученный планшет промывали буфером для промывки (PBS, содержащий 0,05% твина 20) и затем в него добавляли блокирующий буфер (PBS, содержащий 2% обезжиренное молоко и 0,05% твин 20) (200 мкл/лунку), чтобы его заблокировать (при комнатной температуре в течение 1 ч). Полученный планшет промывали буфером для промывки. Затем антитело HuK5-70, антитело HuT6-16-1, антитело HuT6-16-2, антитело K5-70 и антитело T6-16 разбавляли буфером для ELISA (PBS, содержащий 1% обезжиренное молоко и 0,025% твина 20) в диапазоне концентраций от $3,05 \times 10^{-4}$ до 5 мкг/мл, получая серию образцов двукратного разведения. Каждый из полученных при разведении образцов добавляли в количестве 50 мкл/лунку в описанный выше планшет для ELISA (при комнатной температуре в течение 2 ч). Продукт реакции промывали буфером для промывки и затем добавляли HRP-меченое антитело козы против к-цепи человека (SouthernBiotech) или HRP-меченое антитело овцы против IgG мыши (GE Healthcare), каждое из которых было разбавлено в 2000 раз буфером для ELISA (50 мкл/лунку), в качестве антитела для выявления продукта реакции (при комнатной температуре в течение 1 ч). После промывки смеси буфером для промывки добавляли раствор субстрата TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин: SIGMA) (50 мкл/лунку) к полученному продукту, чтобы осуществить цветную реакцию. Затем к продукту реакции добавляли 1 М серную кислоту (25 мкл/лунку), чтобы остановить реакцию. Используя устройство считывания микропланшетов модели 550 (BioRad), измеряли оптическую плотность при 450 нм, при этом в качестве сравнения использовали оптическую плотность при 655 нм. В результате кривые взаимодействия K5-70 и HuK5-70 почти перекрывались друг с другом, и значения EC_{50} составляли 27 и 22 нг/мл соответственно (фиг. 53). Также кривые взаимодействия T6-16, HuT6-16-1 и HuT6-16-2 почти перекрывались друг с другом, и значения EC_{50} для них составляли 30, 27 и 27 нг/мл соответственно (фиг. 54). На основании полученных результатов стало очевидно, что все антитела: антитело HuK5-70, антитело HuT6-16-1 и антитело HuT6-16-2, имеют аффинность по отношению к антигену, эквивалентную аффинности K5-70 или антитела T6-16, которое является исходным антителом для гуманизации.

Пример 41.

Противоопухолевая активность гуманизованного анти-hTROP-2-антитела (HuK5-70) *in vivo*.

Затем исследовали противоопухолевую активность антитела HuK5-70 *in vivo* в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, которые эндогенно экспрессируют TROP-2 человека на клеточной поверхности. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid 7-недельного возраста (день 1). Когда средний объем опухолей достигал 100 мм³, осуществляли деление на группы (день 9). Начиная с 9 дня осуществляли внутрибрюшинное введение антитела с интервалами введения один раз каждые три дня. На 39-й день после трансплантации злокачественных клеток (день 39) объем опухолей в контрольной группе (введение PBS, N=8) составлял $824,3 \pm 188,8$ мм³. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела HuK5-70 (10 мг/кг массы тела, N=8) составлял

455,5±208,6 мм³ (P < 0,01, t-критерий Стьюдента), и, следовательно, образование опухолей было значимо ингибировано в группе введения антитела NuK5-70 (степень ингибирования: 44,7%) (фиг. 55A). Что касается массы опухолей, то масса опухолей в контрольной группе составляла 0,509±0,161 г. Напротив, в группе введения антитела NuK5-70 масса опухолей составляла 0,272±0,162 г (P<0,05, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 46,6% (фиг. 55B).

Пример 42.

Зависимая от дозы противоопухолевая активность гуманизированных анти-hTROP-2-антител (NuK5-70 и NuT6-16-2) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480.

Зависимую от дозы противоопухолевую активность антител NuK5-70 и NuT6-16-2 исследовали в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10⁶ клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid 7-недельного возраста (день 1).

На 9-й день после трансплантации злокачественных клеток (день 9), когда средний объем опухолей достигал 100 мм³, мышей делили на группы: контрольную группу (группа введения PBS, N=8, 101,65±8,35 мм³), группу введения 1 мг/кг массы тела антитела NuK5-70 (N=8, 103,18±9,86 мм³), группу введения 5 мг/кг массы тела антитела NuK5-70 (N=8, 101,34±8,94 мм³), группу введения 10 мг/кг массы тела антитела NuK5-70 (N=8, 101,53±8,98 мм³), группу введения 1 мг/кг массы тела антитела NuT6-16-2 (N=8, 103,18±9,86 мм³), группу введения 5 мг/кг массы тела антитела NuT6-16-2 (N=8, 101,34±8,94 мм³) и группу введения 10 мг/кг массы тела антитела NuT6-16-2 (N=8, 101,53±8,98 мм³). Затем начиная с 9 дня осуществляли внутрибрюшинное введение каждого антитела с интервалами введения один раз каждые три дня. На 48-й день после трансплантации злокачественных клеток (день 48) объем опухолей в контрольной группе составлял 754,67±276,05 мм³. С другой стороны, в группах введения антитела NuK5-70 объем опухолей составлял: в группе введения 1 мг/кг массы тела 521,81±183,45 мм³ (степень ингибирования: 30,9%), объем опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела составлял 258,78±137,02 мм³ (степень ингибирования: 65,7%, P<0,01, t-критерий Стьюдента), и объем опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составлял 314,60±152,89 мм³ (степень ингибирования: 58,3%, P<0,01, t-критерий Стьюдента) (фиг. 56A). В группах введения антитела NuT6-16-2: объем опухолей в группе введения 1 мг/кг массы тела составлял 600,41±319,84 мм³ (степень ингибирования: 20,4%), объем опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела составлял 315,32±189,02 мм³ (степень ингибирования: 58,2%, P<0,01, t-критерий Стьюдента), и объем опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составлял 270,79±266,71 мм³ (степень ингибирования: 64,1%, P<0,01, t-критерий Стьюдента) (фиг. 57A). Что касается массы опухолей на 48-й день, то масса опухолей в контрольной группе составляла 0,422±0,201 г. С другой стороны, в группах введения антитела NuK5-70: масса опухолей в группе введения 1 мг/кг массы тела составляла 0,301±0,160 г (степень ингибирования: 28,7%), масса опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела составляла 0,115±0,083 г (степень ингибирования: 72,7%, P<0,01, t-критерий Стьюдента), и масса опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составляла 0,244±0,181 г (степень ингибирования: 42,2%) (фиг. 56B). В группах введения антитела NuT6-16-2: масса опухолей в группе введения 1 мг/кг массы тела составляла 0,422±0,255 г (степень ингибирования: 0%), масса опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела составляла 0,247±0,151 г (степень ингибирования: 41,5%), и масса опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составляла 0,190±0,190 г (степень ингибирования: 53,1%, P<0,01, t-критерий Стьюдента) (фиг. 57B). На основании полученных результатов было подтверждено, что антитела NuK5-70 и NuT6-16-2 обладают зависимой от дозы противоопухолевой активностью.

Пример 43.

Противоопухолевая активность мышинных моноклональных анти-hTROP-2-антител K5-70 и T6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли яичника человека SK-OV-3.

Противоопухолевую активность антител K5-70 и T6-16 в виде исходных антител *in vivo* исследовали в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли яичника человека SK-OV-3, которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности. Клетки SK-OV-3 (5×10⁶ клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей nude 7-недельного возраста (день 1). На 11-й день после трансплантации злокачественных клеток (день 11) отдельных мышей, у которых явно наблюдали образование опухолей (средний объем опухолей: примерно 50 мм³), делили на группы. Затем начиная с 11 дня осуществляли внутрибрюшинное введение каждого антитела с интервалами введения два раза в неделю. На 56-й день после трансплантации злокачественных клеток (день 56) объем опухолей в контрольной группе (введение PBS, N=8) составлял 652,6±349,1 мм³. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела, N=8) составлял 253,7±137,3 мм³ (P<0,01, t-критерий Стьюдента), и, таким образом, образование опухолей было значимо ингибировано (степень ингибирования: 61,1%); и объем опухолей в группе введения антитела T6-16 (10 мг/кг массы тела, N=8) составлял 214,6±98,6 мм³ (P<0,01, t-критерий Стьюдента).

та), и, таким образом, образование опухолей было значимо ингибировано (степень ингибирования: 67,1%) (фиг. 58А). Что касается массы опухолей, то масса опухолей в контрольной группе составляла $0,413 \pm 0,218$ г. Напротив, масса опухолей в группе введения антитела К5-70 составляла $0,194 \pm 0,112$ г ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 53,0%; и масса опухолей в группе введения антитела Т6-16 составляла $0,183 \pm 0,093$ г ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 55,7% (фиг. 58В).

Пример 44.

Противоопухолевая активность мышинных моноклональных анти-hTROP-2-антител К5-70 и Т6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468.

Подобным образом противоопухолевую активность антител К5-70 и Т6-16 *in vivo* исследовали в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468, которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности. Клетки MDA-MB-468 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей *nude* 7-недельного возраста (день 1). На 12-й день после трансплантации злокачественных клеток (день 12) отдельных мышей, у которых явно наблюдали образование опухолей (средний объем опухолей: примерно 50 мм^3), делили на группы. Затем начиная с 12-го дня осуществляли внутрибрюшинное введение каждого антитела с интервалами введения два раза в неделю. На 54-й день после трансплантации злокачественных клеток (день 54) объем опухолей в контрольной группе (введение PBS, N=8) составлял $218,6 \pm 75,5 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела К5-70 (10 мг/кг массы тела, N=8) составлял $70,2 \pm 37,4 \text{ мм}^3$ ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и, следовательно, образование опухолей было значимо ингибировано (степень ингибирования: 67,9%); и объем опухолей в группе введения антитела Т6-16 (10 мг/кг массы тела, N=8) составлял $88,3 \pm 42,9 \text{ мм}^3$ ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и, следовательно, образование опухолей было значимо ингибировано (степень ингибирования: 59,6%) (фиг. 59А). Что касается массы опухолей на 54-й день, то она в контрольной группе составляла $0,142 \pm 0,049$ г. Напротив, масса опухолей в группе введения антитела К5-70 составляла $0,050 \pm 0,033$ г ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 64,8%; и масса опухолей в группе введения антитела Т6-16 составляла $0,077 \pm 0,046$ г ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 45,8% (фиг. 59В).

Пример 45.

Противоопухолевая активность мышинных моноклональных анти-hTROP-2-антител К5-70 и Т6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3.

Подобным образом противоопухолевую активность антител К5-70 и Т6-16 *in vivo* исследовали в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3, которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности. Клетки Calu-3 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей *nude* 7-недельного возраста (день 1). На 9-й день после трансплантации злокачественных клеток (день 9) отдельных мышей, у которых явно наблюдали образование опухолей (средний объем опухолей: примерно 100 мм^3), делили на группы. Затем начиная с 9-го дня осуществляли внутрибрюшинное введение каждого антитела с интервалами введения два раза в неделю. На 41-й день после трансплантации злокачественных клеток (день 41) объем опухолей в контрольной группе (введение PBS, N=8) составлял $395,7 \pm 221,2 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела К5-70 (10 мг/кг массы тела, N=8) составлял $120,7 \pm 125,6 \text{ мм}^3$ ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и, следовательно, образование опухолей было значимо ингибировано (степень ингибирования: 69,5%); и объем опухолей в группе введения антитела Т6-16 (10 мг/кг массы тела, N=8) составлял $146,3 \pm 128,4 \text{ мм}^3$ ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), и, следовательно, образование опухолей было значимо ингибировано (степень ингибирования: 63,0%) (фиг. 60А). Что касается массы опухолей, то она в контрольной группе составляла $0,301 \pm 0,189$ г. Напротив, масса опухолей в группе введения антитела К5-70 составляла $0,08 \pm 0,085$ г ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 73,5%; и масса опухолей в группе введения антитела Т6-16 составляла $0,106 \pm 0,096$ г ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 64,9% (фиг. 60В).

Пример 46.

Противоопухолевая активность мышинного моноклонального анти-hTROP-2-антитела К5-70 в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли желчных протоков человека ТФК-1.

Подобным образом противоопухолевую активность антитела К5-70 *in vivo* исследовали в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли желчных протоков человека ТФК-1, которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности. Клетки ТФК-1 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей *nude* 7-недельного возраста (день 1) и с того же дня начинали внутрибрюшинное введение антитела с интер-

валами введения два раза в неделю. На 31-й день после трансплантации злокачественных клеток (день 31) объем опухолей в контрольной группе (введение PBS, N=5) составлял $1000,4 \pm 268,9$ мм³. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела, N=5) составлял $197,2 \pm 215,5$ мм³ (P<0,01, t-критерий Стьюдента), и, следовательно, образование опухолей было значимо ингибировано (степень ингибирования: 80,3%) (фиг. 61A). Что касается массы опухолей, то масса опухолей в контрольной группе составляла $0,443 \pm 0,070$ г. Напротив, масса опухолей в группе введения антитела K5-70 составляла $0,063 \pm 0,052$ г (P<0,01, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 85,8% (фиг. 61B).

Пример 47.

Анализ avidности антител HuK5-70 и HuT6-16-2.

Антигенсвязывающую активность антител HuK5-70 и HuT6-16-2 исследовали согласно способу ELISA (ELISA с покрыванием антигеном с низкой плотностью), используя 96-луночный планшет, который был покрыт антигеном с низкой плотностью. Рекомбинантный белок hTACSTD2-Fc-His (Creative BioMart), который был приготовлен в концентрации 0,1 мкг/мл с использованием 0,1 М ацетатного буфера (pH 5,3), добавляли в количестве 50 мкл/лунку в 96-луночный планшет и покрывание осуществляли при 4°C в течение ночи. Затем осуществляли такой же анализ, который описан в примере 40. Тестируемые антитела разбавляли буфером для ELISA (PBS, содержащий 1% обезжиренное молоко и 0,025% твина 20), получая образцы с диапазоном концентраций от 20 мкг/мл до серии двукратных разведений (15 образцов) и используя их. В результате было обнаружено, что антитело HuT6-16-2 обладает активностью связывания, которая почти эквивалентна активности связывания антитела T6-16 (при этом их значения EC₅₀ составляли 49 и 41 нг/мл соответственно), но значение EC₅₀ для антитела HuK5-70 было примерно в 20 раз выше, чем значение для антитела K5-70 (при этом их значения EC₅₀ составляли 222 и 12 нг/мл соответственно; фиг. 62).

Затем исследовали антигенсвязывающую активность антител HuK5-70 и K5-70 в ELISA с целью анализа взаимодействия моновалентного антигена-антитела. Антитело козы против IgG человека (Fcγ-специфичное) (Southern Biotech), которое было разбавлено до 1 мкг/мл в 0,1 М ацетатном буфере (pH 5,3), и антитело козы против IgG мыши (специфичное к γ-цепи) (Southern Biotech), которое было разбавлено до 3 мкг/мл, добавляли в количестве 50 мкл/лунку в 96-луночный планшет. Затем осуществляли покрывание при 4°C в течение ночи. Затем продукт реакции промывали буфером для промывки (PBS, содержащий 0,05% твин 20) и затем добавляли блокирующий буфер (PBS, содержащий 2% обезжиренное молоко и 0,05% твин 20) (200 мкл/лунку), чтобы его заблокировать (при комнатной температуре в течение 1 ч). Полученный планшет промывали буфером для промывки. Затем к описанному выше планшету добавляли тестируемое антитело, которое было разбавлено до 1 мкг/мл буфером для ELISA (PBS, содержащий 1% обезжиренное молоко и 0,025% твин 20), в количестве 50 мкл/лунку. Во время такой операции антитело HuK5-70 добавляли в лунку, покрытую антителом козы против IgG человека (Fcγ-специфичным), и антитело K5-70 добавляли в лунку, покрытую антителом козы против IgG мыши (специфичным к γ-цепи). Смесь оставляли при комнатной температуре на 1 ч и затем продукт реакции промывали буфером для промывки. Рекомбинантный белок внеклеточной области hTROP-2, описанный в примере 3 (EC hTROP-2), разбавляли буфером для ELISA, получая образцы в диапазоне концентраций от 5 мкг/мл до серии трехкратных разведений (10 образцов). Полученный таким образом образец добавляли в планшет в количестве 50 мкл/лунку. Смесь оставляли при комнатной температуре на 1 ч и затем продукт реакции промывали буфером для промывки. Затем к продукту реакции добавляли антитело против His (G-18) (Santa Cruz), которое было разбавлено до 2 мкг/мл буфером для ELISA, в качестве первого антитела (50 мкл/лунку). Полученную смесь оставляли при комнатной температуре на 1 ч и затем ее промывали буфером для промывки. Затем к продукту реакции добавляли HRP-меченое антитело против IgG кролика (GE Healthcare), которое было разбавлено в 1000 раз буфером для ELISA, в качестве второго антитела (50 мкл/лунку). Полученную смесь оставляли при комнатной температуре на 1 ч и затем ее промывали буфером для промывки. Затем к полученному продукту добавляли раствор субстрата TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин: SIGMA) в количестве 50 мкл/лунку, чтобы осуществить цветную реакцию. Затем к продукту реакции добавляли 1 М серную кислоту (25 мкл/лунку), чтобы остановить реакцию. Используя устройство для считывания микропланшетов модели 550 (BioRad), измеряли оптическую плотность при 450 нм, при этом оптическую плотность при 655 нм использовали для сравнения. В результате значения EC₅₀, вычисленные на основании кривых связывания белка hTROP-2EC с антителами K5-70 и HuK5-70, составляли 7 и 6 нг/мл соответственно (фиг. 63). Полученные результаты демонстрируют, что антитело HuK5-70 и антитело K5-70 обладают эквивалентной аффинностью по отношению к антигену при взаимодействии моновалентный антиген-антитело.

Как описано в примере 40, в способе ELISA с использованием 96-луночного планшета, который был покрыт антигеном с высокой плотностью (0,5 мкг/мл) (ELISA с покрыванием антигеном), аффинность по отношению к антигену антитела K5-70 была эквивалентна аффинности по отношению к антигену антитела HuK5-70 (фиг. 53). Таким образом, было высказано предположение, что антигенсвязывающая активность антитела HuK5-70, которая относительно меньше, чем активность антитела K5-70 в спо-

собе ELISA, в котором планшет покрывали антигеном с низкой плотностью (0,1 мкг/мл), может быть вызвана тем фактом, что гибкость при движении двух антигенсвязывающих плеч, а именно "авидность", относительно меньше в случае антитела HuK5-70, чем антитела K5-70.

Пример 48.

Получение и характеристика мутантов гуманизированного антитела K5-70.

В целях улучшения "авидности" антитела HuK5-70 осуществляли следующий эксперимент.

Обусловлена ли указанная выше относительно низкая "авидность" антитела HuK5-70 областями VH или VL, исследовали в следующем эксперименте. Сначала гены, кодирующие варибельную область Н-цепи (K5-70 VH) и варибельную область L-цепи (K5-70 VL) антитела K5-70 в качестве исходного антитела, получали синтезом генов (Oregon). В ходе синтеза генов последовательность Козака (ACC ACC) добавляли с 5'-концевой стороны последовательности каждого из генов VH K5-70 и VL K5-70. Затем добавляли сайт EcoRI (GAA TTC) в качестве сайта фермента рестрикции к 5'-концу VH K5-70 и сайт NheI (GCT AGC) добавляли в качестве сайта фермента рестрикции к его 3'-концу. Подобным образом, сайт AgeI (ACC GGT) добавляли в качестве сайта фермента рестрикции к 5'-концу VL K5-70 и сайт BsiWI (CGT ACG) добавляли в качестве сайта фермента рестрикции к его 3'-концу. Каждый из синтезированных генов, ген VH K5-70 и ген VL K5-70, включали в вектор pCR2.1 (Invitrogen). Последовательности генов VH и VL K5-70, полученных синтезом генов, показаны на фиг. 64 и 65 соответственно. Гены VH K5-70 и VL K5-70, включенные в вектор pCR2.1, отщепляли ферментами рестрикции EcoRI и NheI, и AgeI и BsiWI соответственно и затем фрагменты генов извлекали. Затем отщепленный ген VH K5-70 встраивали в EcoRI/NheI-сайт вектора pFUSE-CHlg-hG1 (InvivoGen) в качестве вектора экспрессии для экспрессии формы IgG1 человека, тогда как ген VL K5-70 встраивали в AgeI/BsiWI-сайт вектора pFUSE2-CLlg-hk (InvivoGen) в качестве вектора, экспрессирующего форму Igk человека, таким образом получая химерные конструкции мыши-человека (pFUSE-CHlg-MuK5-70 и pFUSE2-CLlg-MuK5-70).

Полученным таким образом конструкциям, и вектору, экспрессирующему Н-цепь HuK5-70 (pFUSE-CHlg-HuK5-70), и вектору, экспрессирующему L-цепь HuK5-70 (pFUSE2-CLlg-HuK5-70), которые были получены в примере пример 36, создавали возможность совместно экспрессироваться в клетках 293F (Invitrogen) при сочетаниях 1-4, указанных в табл. 12.

Таблица 12

	Н-цепь	L-цепь	Созданное антитело	Примечания
1	pFUSE-CHlg-HuK5-70	pFUSE2-CLlg-HuK5-70	антитело HuK5-70	гуманизированное антитело K5-70
2	pFUSE-CHlg-HuK5-70	pFUSE2-CLlg-MuK5-70	антитело HuVH/MuVL	гуманизированная VH K5-70/VL K5-70 мыши
3	pFUSE-CHlg-MuK5-70	pFUSE2-CLlg-HuK5-70	антитело MuVH/HuVL	VH мыши K5-70/гуманизированная VL K5-70
4	pFUSE-CHlg-MuK5-70	pFUSE2-CLlg-MuK5-70	антитело ChK5-70	химерное антитело K5-70

Транфекцию векторов экспрессии, описанных выше, в клетки 293F (Invitrogen) осуществляли, используя реагент NeoFection (Astec) согласно способу, описанному в инструкциях, прилагаемых к реагенту. После осуществления трансфекции полученные клетки культивировали в течение 5 дней, используя среду для экспрессии Freestyle 293 (Invitrogen) при 37°C в CO₂-инкубаторе с концентрацией CO₂ 8%. Затем получали надосады культуры. Концентрацию антитела в надосаде культуры измеряли способом ELISA типа "сэндвича". В частности, антитело козы против IgG человека (Fcγ-специфичное) (Southern Biotech), которое было разбавлено до 1 мкг/мл в PBS, добавляли в количестве 50 мкл/лунку в 96-луночный планшет. Затем осуществляли покрывание при 4°C в течение ночи. Затем продукт реакции промывали буфером для промывки (PBS, содержащий 0,05% твин 20) и затем в планшет добавляли блокирующий буфер (PBS, содержащий 2% обезжиренное молоко и 0,05% твин 20) (200 мкл/лунку) для блокирования при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученный планшет промывали буфером для промывки. Затем надосады культуры, который был разбавлен до соответствующей кратности разведения буфером для ELISA (PBS, содержащий 1% обезжиренное молоко и 0,025% твин 20), добавляли в количестве 50 мкл/лунку в описанный выше планшет и затем проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч. В качестве стандартного препарата использовали антитело HuK5-70. Затем продукт реакции промывали буфером для промывки. В качестве антитела для выявления к продукту реакции до-

бавляли HRP-меченое антитело козы против карпа человека (специфичное для κ-цепи) (Southern Biotech), которое было разбавлено в 1000 раз буфером для ELISA, в количестве 50 мкл/лунку, и затем осуществляли реакцию при комнатной температуре в течение 1 ч. Продукт реакции промывали буфером для промывки и затем к полученному продукту добавляли раствор субстрата ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин: SIGMA) в количестве 50 мкл/лунку, чтобы осуществить цветную реакцию. Затем к продукту реакции добавляли 1 М серную кислоту (25 мкл/лунку), чтобы остановить реакцию. Используя устройство для считывания микропланшетов iMark Microplate (BioRad), измеряли оптическую плотность при 450 нм, при этом оптическую плотность при 655 нм использовали для сравнения. Связывание 4 типов антител, находящихся в надосадках культур, с hTROP-2 измеряли описанным выше способом ELISA с покрыванием антигеном с низкой плотностью. В результате было обнаружено, что связывающая активность антитела MuVH/HuVL, состоящего из VH K5-70 VH мыши и VL HuK5-70, по отношению к hTROP-2 была эквивалентна активности антитела ChK5-70, но что связывающая активность антитела HuVH/MuVL, состоящего из VH HuK5-70 и VL K5-70 мыши, была относительно более низкой, чем активность ChK5-70 (фиг. 66). Полученные результаты свидетельствуют, что VH HuK5-70 вовлечена в "авидность" HuK5-70. Поэтому, чтобы получить модифицированные антитела, в которых "авидность" антитела HuK5-70 улучшена, осуществляли аминокислотную замену в VH HuK5-70. Как было обнаружено при выравнивании аминокислотных последовательностей VH HuK5-70 и VH K5-70, которое показано на фиг. 41, всего 17 аминокислот с номерами аминокислот 5, 7, 11, 12, 13, 20, 38, 40, 44, 73, 75, 81, 82с, 83, 87, 108 и 109, отличаются в VH HuK5-70 и VH K5-70 (при этом номера аминокислот использованы в соответствии с определениями Кабата и соавторов (1991)). Указанные выше аминокислоты VH HuK5-70 заменяли соответствующими аминокислотами VH K5-70, так что в результате синтеза генов были получены мутанты. Затем получали вектор экспрессии (мутант pFUSE-CHlg-HuK5-70). В публикации Landolfi с соавторами (J. Immunol. 166: 1748, 2001) сообщалось, что аминокислоты в положениях 11 и 38 VH вовлечены в авидность гуманизированного антитела и что авидность и биологическая активность улучшены при замене двух указанных выше аминокислот соответствующими аминокислотами, полученными от мыши. Таким образом также получали двойной мутант, содержащий замены аминокислот в положениях 11 и 38. Названия полученных таким образом 18 типов мутантов VH HuK5-70 и их аминокислотные последовательности показаны на фиг. 67.

Каждый из полученных 18 типов мутантов VH HuK5-70 (векторы экспрессии для мутантов pFUSE-CHlg-HuK5-70) объединяли с вектором экспрессии L-цепи HuK5-70 (pFUSE2-CLlg-HuK5-70) и каждый их полученных таким образом векторов экспрессии трансфицировали в клетки HEK293. Затем, используя полученный надосадок культуры, исследовали связывающую активность каждого из антител с аминокислотными заменами по отношению к hTROP-2, используя ELISA с покрыванием антигеном с низкой плотностью. В результате обнаружили, что среди 18 типов мутантов VH HuK5-70 мутант R44G, в котором R (аргинин) в положении 44 VH HuK5-70 был заменен G (глицином) (HuK5-70 R44G; который называют далее HuK5-70-2), по-видимому, обладает улучшенной антигенсвязывающей активностью (фиг. 68). Последовательность гена VH HuK5-70 R44G (далее называемого VH2 HuK5-702) показана на фиг. 69.

Пример 49.

Очистка и характеристика антитела HuK5-70-2.

Антитело HuK5-70-2, которое представляет собой мутантное антитело HuK5-70 R44G, очищали следующим образом. А именно, pFUSE-CHlg-HuK5-70 R44G и pFUSE2-CLlg-HuK5-70 трансфицировали в клетки 293F и затем полученные клетки культивировали в течение 5 дней. Затем получали надосадок культуры. Антитело HuK5-70-2 очищали из полученного надосадка культуры, используя колонку с рекомбинантным белком А-сефарозой Fast Flow (GE Healthcare). Очищенное антитело HuK5-70-2 загружали на SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях. В результате обнаружена H-цепь примерно 50 кДа и L-цепь примерно 25 кДа. Чистота каждого антитела составляла 95% или больше (фиг. 70).

Связывающую активность очищенных антител HuK5-70-2 и HuK5-70 по отношению к hTROP-2 исследовали в ELISA с покрыванием антигеном с высокой плотностью и ELISA с покрыванием антигеном с низкой плотностью. Аффинность антител исследовали в ELISA с покрыванием антигеном с высокой плотностью (используя 96-луночный планшет, который покрывали 1 мкг/мл hTROP-2). В результате было обнаружено, что кривая связывания антитела HuK5-70 почти перекрывалась с кривой связывания антитела HuK5-70-2 и что их аффинности были эквивалентны друг другу. Затем исследовали авидность антител в ELISA с покрыванием антигеном с низкой плотностью (используя 96-луночный планшет, который покрывали 0,1 мкг/мл hTROP-2). В результате было обнаружено, что так же, как и в случае использования надосадка культуры, антигенсвязывающая активность антитела HuK5-70-2 была явно выше, чем антигенсвязывающая активность антитела HuK5-70 (фиг. 71). В частности, значение EC_{50} антитела K5-70 составляло 11,4 нг/мл, значение EC_{50} антитела HuK5-70 составляло 33,4 нг/мл и значение EC_{50} антитела HuK5-70-2 составляло 11,4 нг/мл. Таким образом, было показано, что антитело HuK5-70-2 имеет улучшенную авидность по сравнению с антителом HuK5-70 и что антитело HuK5-70-2 имеет активность, эквивалентную активности антитела K5-70.

Пример 50.

Измерение активности в зависимой от антител клеточной цитотоксичности (ADCC) гуманизированных анти-hTROP-2-антител.

(1) Получение раствора клеток-мишеней.

В качестве клеток-мишеней использовали линию клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, линию клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-59 и линию клеток злокачественной опухоли простаты человека РС-3, каждая из которых эндогенно экспрессирует hTROP-2. Клетки-мишени, культивируемые в чашках для культур клеток диаметром 10 см, собирали из чашек обработкой трипсином и затем суспендировали в среде для анализа. Для ADCC-анализа использовали среду Leivovitz L-15 (для клеток SW480) или среду RPMI-1640 (для клеток РК-59 и РС-3), в которую добавляли 0,5% FBS. После осуществления центрифугирования (при 1000 об/мин в течение 3 мин при комнатной температуре) осадки получали с плотностью клеток 2×10^5 клеток/мл в такой же среде, как среда, описанная выше, и, таким образом, получали раствор с клетками-мишенями.

(2) Отделение мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Собирали венозную кровь здоровых доноров с гепарином и затем разбавляли в 2 раза, используя PBS. Затем разбавленную кровь наслаивали на Lymphoprep (Daiichi Kagaku Yakuhin K.K.) и затем центрифугировали (при комнатной температуре при 750 об/мин в течение 5 мин и затем при 2000 об/мин в течение 20 мин). После завершения центрифугирования мононуклеарные клетки (здоровые моноциты периферической крови) извлекали из фракции промежуточного слоя и затем три раза промывали PBS. Затем готовили суспензию клеток, используя среду для анализа, и полученные клетки использовали в качестве эффекторных клеток.

(3) ADCC-активность гуманизированных анти-hTROP-2-антител (антител HuK5-70, HuK5-70-2 и HuT6-16-2).

По 100 мкл (2×10^4 клеток/лунку) полученного раствора с клетками-мишенями распределяли в 96-луночном планшете с плоским дном (производства FALCON). Затем в планшет добавляли мононуклеарные клетки периферической крови человека (эффекторные клетки) так, чтобы соотношение между эффекторными клетками и клетками-мишенями составляло 40:1. Затем в планшет добавляли каждое из гуманизированных анти-hTROP-2-антител (антитела HuK5-70, HuK5-70-2 и HuT6-16-2) в качестве тестируемых антител до конечной концентрации 0,1-30 мкг/мл. Смесь доводили до общего объема 200 мкл и затем культивировали в CO₂-инкубаторе (при 37°C и 5% CO₂) в течение 6 ч. После завершения культивирования измеряли активность лактатдегидрогеназы, высвобождаемой из цитоплазмы клеток-мишеней, поврежденных эффекторными клетками, используя набор для определения цитотоксичности (LDH) (Roche, № в каталоге 11644793001) согласно протоколам, прилагаемым к набору, и затем оценивали ADCC-активность, используя результат измерения в качестве показателя.

Как показано на фиг. 72А-72С, очевидно, что антитела HuK5-70 и HuT6-16-2 зависимым от дозы образом проявляют ADCC-активность по отношению к линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480 (фиг. 72А), линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-59 (фиг. 72В) и линии клеток злокачественной опухоли простаты человека РС-3 (фиг. 72С), каждая из которых экспрессирует hTROP-2 на клеточной поверхности. Кроме того, как показано на фиг. 72В и 72С, очевидно, что антитело HuK5-70-2 проявляет ADCC-активность по отношению к линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы РК-59 и линии клеток злокачественной опухоли простаты человека РС-3, при этом указанная выше ADCC-активность сильнее, чем активность антитела HuK5-70. Как указано выше, антитело HuK5-70-2 представляет собой антитело, способность связывания которого (авидность) с hTROP-2 была улучшена заменой R (аргинина) в положении 44 VH HuK5-70 на G (глицин). Было показано, что авидность антитела HuK5-70-2, которая была улучшена по сравнению с антителом HuK5-70, отражается в ADCC-активности. Поэтому было высказано предположение, что антитело HuK5-70-2 обладает превосходной противоопухолевой активностью даже *in vivo*, как в случае антитела HuK5-70 (при этом антитело HuK5-70-2 предпочтительно может обладать более высокой противоопухолевой активностью, чем антитело HuK5-70). На основании описанных выше результатов показано, что антитела HuK5-70, HuK5-70-2 и HuT6-16-2 могут быть терапевтическими антителами, применимыми по отношению к злокачественной опухоли, которая экспрессирует hTROP-2 на клеточной поверхности.

Промышленная применимость

В настоящем изобретении предлагается антитело, которое специфично взаимодействует с hTROP-2 и обладает высокой противоопухолевой активностью *in vivo*, и, в частности, моноклональное антитело, обладающее высокой противоопухолевой активностью *in vivo* в низкой дозе, и, в частности, такое антитело, которое является гуманизированным антителом. Кроме того, в настоящем изобретении предлагаются гибридома, которая продуцирует антитело, фрагмент антитела, комплекс антитела или т.п. и различные типы лекарственных средств, фармацевтическая композиция для диагностики или лечения опухоли, способ выявления опухоли и набор для выявления или диагностики опухоли.

Свободный текст списка последовательностей

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.
SEQ ID NO: 74. Рекомбинантная ДНК.
SEQ ID NO: 75. Синтетическая конструкция (рекомбинантный белок).
SEQ ID NO: 76. Рекомбинантная ДНК.
SEQ ID NO: 77. Синтетическая конструкция (рекомбинантный белок).
SEQ ID NO: 78. Рекомбинантная ДНК.
SEQ ID NO: 79. Синтетическая конструкция (рекомбинантный белок).
SEQ ID NO: 80. Рекомбинантная ДНК.
SEQ ID NO: 81. Синтетическая конструкция (рекомбинантный белок).
SEQ ID NO: 82. Рекомбинантная ДНК.
SEQ ID NO: 83. Синтетическая конструкция (рекомбинантный белок).
SEQ ID NO: 92. Рекомбинантный белок.
SEQ ID NO: 93. Рекомбинантный белок.
SEQ ID NO: 94. Рекомбинантный белок.
SEQ ID NO: 95. Рекомбинантный белок.
SEQ ID NO: 96. Рекомбинантный белок.
SEQ ID NO: 97. Рекомбинантный белок.
SEQ ID NO: 98. Рекомбинантный белок.
SEQ ID NO: 99. Рекомбинантная ДНК.
SEQ ID NO: 100. Рекомбинантная ДНК.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против TROP-2 человека, в котором V-область H-цепи антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92 или 98 и V-область L-цепи антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93.

2. Антитело по п.1, в котором аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области H-цепи антитела представляют собой SEQ ID NO: 36-38 соответственно и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи антитела представляют собой SEQ ID NO: 41-43 соответственно.

3. Антитело по п.1 или 2, которое является гуманизированным антителом.

4. Антитело по любому из пп.1-3, которое обладает противоопухолевой активностью *in vivo*.

5. Антитело по любому из пп.1-4, которое проявляет 50% или большую ингибиторную активность в отношении роста опухоли при дозе 5-20 мг/кг массы тела.

6. Антитело по любому из пп.1-4, которое проявляет 50% или большую ингибиторную активность в отношении роста опухоли при однократном введении антитела в дозе 10 мг/кг массы тела.

7. Антитело по любому из пп.1-6, которое обладает противоопухолевой активностью в отношении двух или более типов линий опухолевых клеток человека.

8. Антитело по любому из пп.1-7, константа диссоциации (значение K_d) которого равна $1,0 \times 10^{-10}$ М или меньше.

9. Антитело по любому из пп.1-8, которое представляет собой моноклональное антитело.

10. Антитело по любому из пп.4-9, где опухоль представляет собой по меньшей мере один тип, выбранный из группы, включающей рак поджелудочной железы человека, рак предстательной железы человека, колоректальный рак человека, рак молочной железы человека, рак яичника человека, рак легкого человека и рак желчного протока человека.

11. Антитело по любому из пп.4-9, где тип опухоли представляет собой по меньшей мере один тип, выбранный из группы, включающей рак поджелудочной железы человека, колоректальный рак человека, рак легкого человека, рак молочной железы человека и рак яичников человека.

12. Антитело по любому из пп.4-11, где опухоль представляет собой рецидивирующую злокачественную опухоль или метастатическую злокачественную опухоль.

13. Антитело по любому из пп.7-12, где линии опухолевых клеток относятся по меньшей мере к двум типам, выбранным из группы, состоящей из

линии клеток рака поджелудочной железы человека PK-59;
 линии клеток рака поджелудочной железы человека BxPC-3;
 линии клеток рака поджелудочной железы человека KP-3L;
 линии клеток рака поджелудочной железы человека KP-2;
 линии клеток рака поджелудочной железы человека PK-1;
 линии клеток рака поджелудочной железы человека PK-45H;
 линии клеток рака поджелудочной железы человека PK-45P;
 линии клеток рака поджелудочной железы человека TCC-PAN2;
 линии клеток рака поджелудочной железы человека SUIT-2;
 линии клеток рака кишечника человека CACO-2;
 линии клеток рака кишечника человека SW480;
 линии клеток рака кишечника человека DLD-1;
 линии клеток рака кишечника человека HCT 116;
 линии клеток рака молочной железы человека JIMT-1;
 линии клеток рака молочной железы человека HCC1143;
 линии клеток рака молочной железы человека MCF-7;
 линии клеток рака молочной железы человека MDA-MB-468;
 линии клеток рака простаты человека DU145;
 линии клеток рака простаты человека PC-3;
 линии клеток рака яичника человека SK-OV-3;
 линии клеток рака легкого человека Calu-3 и
 линии клеток рака желчных протоков человека TFK-1.

14. Антитело по любому из пп.7-12, где линии опухолевых клеток относятся по меньшей мере к двум типам, выбранным из группы, включающей

линии клеток рака поджелудочной железы человека PK-59;
 линии клеток рака поджелудочной железы человека BxPC-3;
 линии клеток рака кишечника человека SW480;
 линии клеток рака легкого человека Calu-3;
 линии клеток рака молочной железы человека MDA-MB-468 и
 линии клеток рака яичника человека SK-OV-3.

15. Фрагмент антитела, способный связываться с TROP-2 человека, полученный из антитела по лю-

бому из пп.1-14.

16. Фрагмент антитела по п.15, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 или 98 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

17. Конъюгат антитело-лекарственное средство для доставки вещества к мишеневым опухолевым клеткам, который содержит антитело по любому из пп.1-14 и вещество, обладающее противоопухолевой активностью и/или которое способно уничтожать клетки.

18. Конъюгат фрагмент антитела-лекарственное средство для доставки вещества к мишеневым опухолевым клеткам, который содержит фрагмент антитела по п.15 или 16 и вещество, обладающее противоопухолевой активностью и/или которое способно уничтожать клетки.

19. Конъюгат по любому из пп.17 или 18, где опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, включающей рак поджелудочной железы человека, рак простаты человека, колоректальный рак человека, рак молочной железы человека, рак яичника человека, рак легкого человека и рак желчных протоков человека.

20. Конъюгат по любому из пп.17 или 18, где тип опухоли представляет собой по меньшей мере один тип, выбранный из группы, включающий рак поджелудочной железы человека, колоректальный рак человека, рак легкого человека, рак молочной железы человека и рак яичников человека.

21. Конъюгат по любому из пп.17-20, где опухоль представляет собой рецидивирующую злокачественную опухоль или метастатическую злокачественную опухоль.

22. Фармацевтическая композиция для лечения опухоли, которая содержит по меньшей мере одно антитело по любому из пп.1-14, фрагмент антитела по п.15 или 16 или конъюгат по любому из пп.17-21 и фармацевтически приемлемый носитель.

23. Композиция по п.22, которая не вызывает побочного эффекта, заключающегося в снижении массы.

24. Композиция для диагностики опухоли, которая содержит по меньшей мере одно антитело по любому из пп.1-14, фрагмент антитела по п.15 или 16 или конъюгат по любому из пп.17-21 и реагент для осуществления детекции опухоли.

25. Композиция по любому из пп.22-24, где опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, включающей рак поджелудочной железы человека, рак простаты человека, колоректальный рак человека, рак молочной железы человека, рак яичника человека, рак легкого человека и рак желчных протоков человека.

26. Композиция по любому из пп.22-25, где опухоль представляет собой рецидивирующую злокачественную опухоль или метастатическую злокачественную опухоль.

27. Терапевтическое противоопухолевое средство, которое содержит по меньшей мере одно антитело по любому из пп.1-14, фрагмент антитела по п.15 или 16 или конъюгат по любому из пп.17-21.

28. Терапевтическое средство по п.27, которое не вызывает побочного эффекта, заключающегося в снижении массы.

29. Терапевтическое средство по п.27 или 28, где опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, включающей рак поджелудочной железы человека, рак простаты человека, колоректальный рак человека, рак молочной железы человека, рак яичника человека, рак легкого человека и рак желчных протоков человека.

30. Диагностическое противоопухолевое средство, которое содержит по меньшей мере одно антитело по любому из пп.1-14, фрагмент антитела по п.15 или 16 и конъюгат по любому из пп.17-21.

31. Диагностическое средство по п.30, где опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, включающей рак поджелудочной железы человека, рак простаты человека, колоректальный рак человека, рак молочной железы человека, рак яичника человека, рак легкого человека и рак желчных протоков человека.

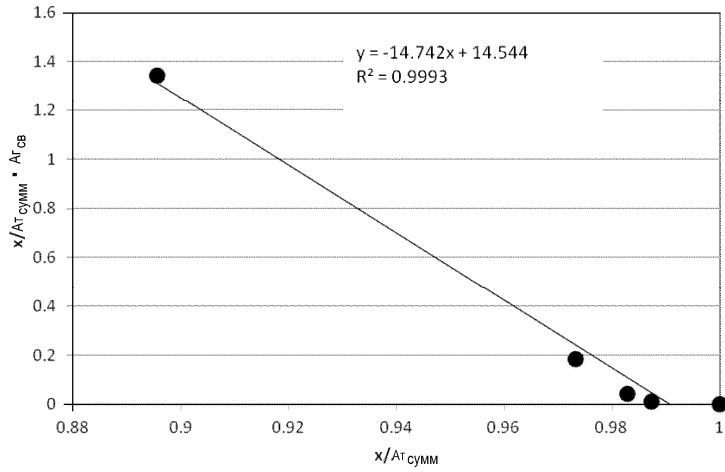
32. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп.1-14.

33. Полинуклеотид, кодирующий фрагмент антитела по п.15 или 16.

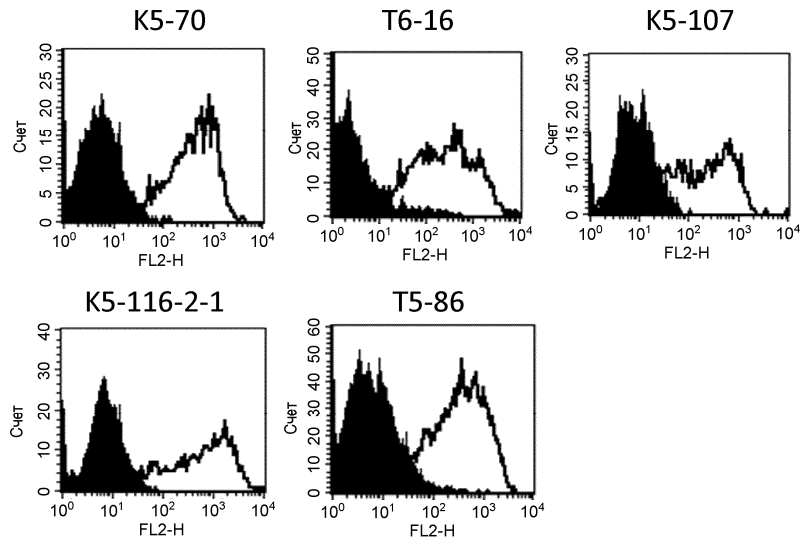
34. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.32 или 33.

35. Трансформированная клетка для получения антитела по любому из пп.1-14 или фрагмента антитела по п.15 или 16, содержащая вектор по п.34.

Аффинность

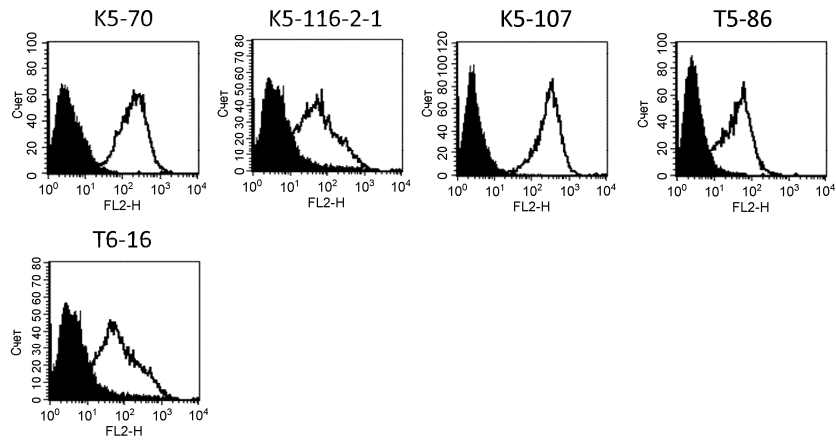


Фиг. 1

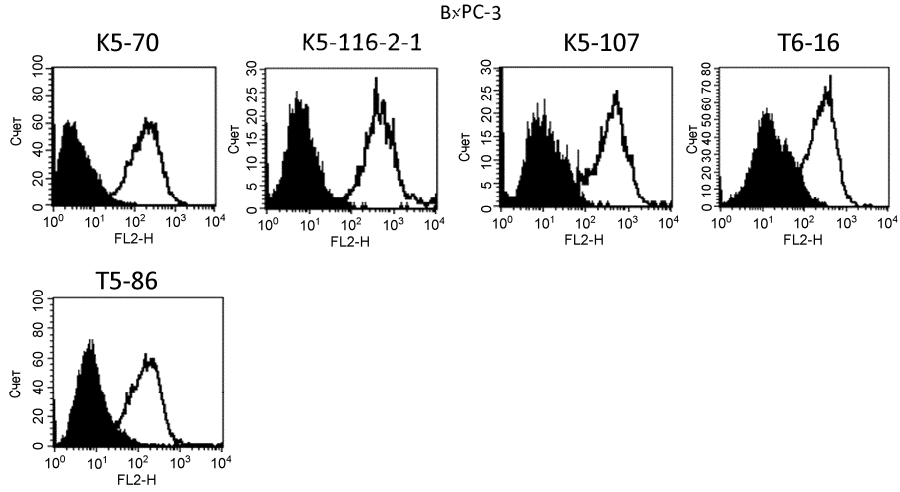


Фиг. 2

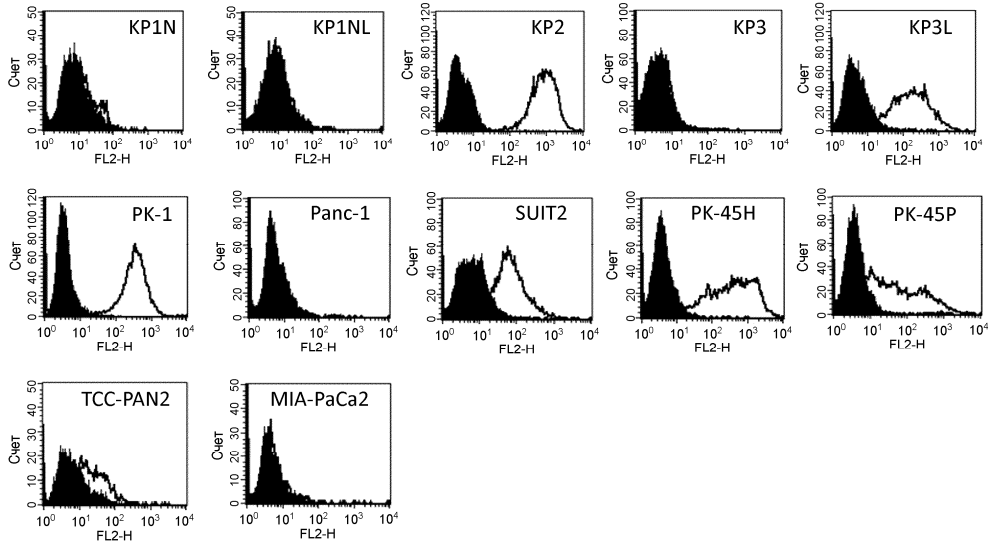
PK-53



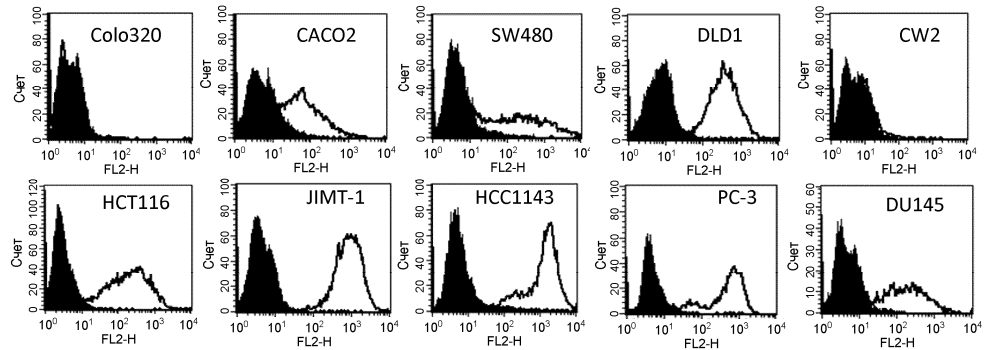
Фиг. 3



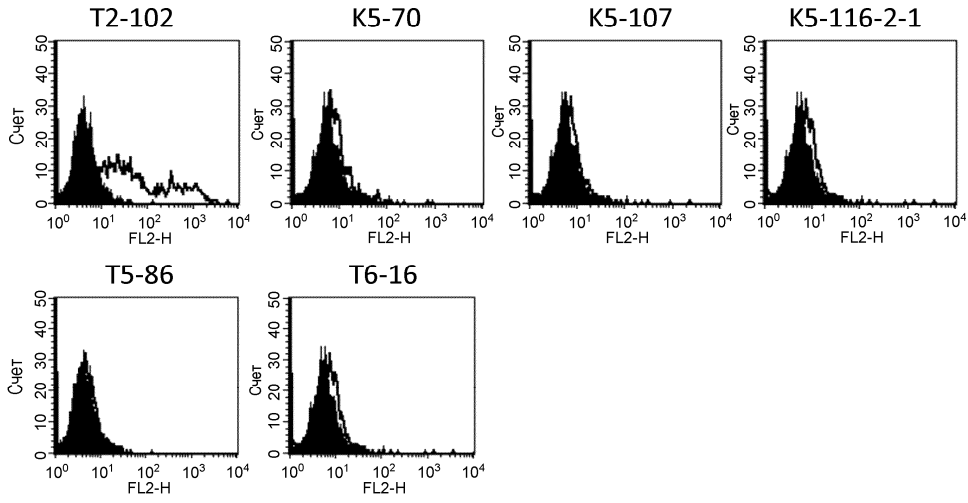
Другие линии злокачественных клеток



Другие линии злокачественных клеток

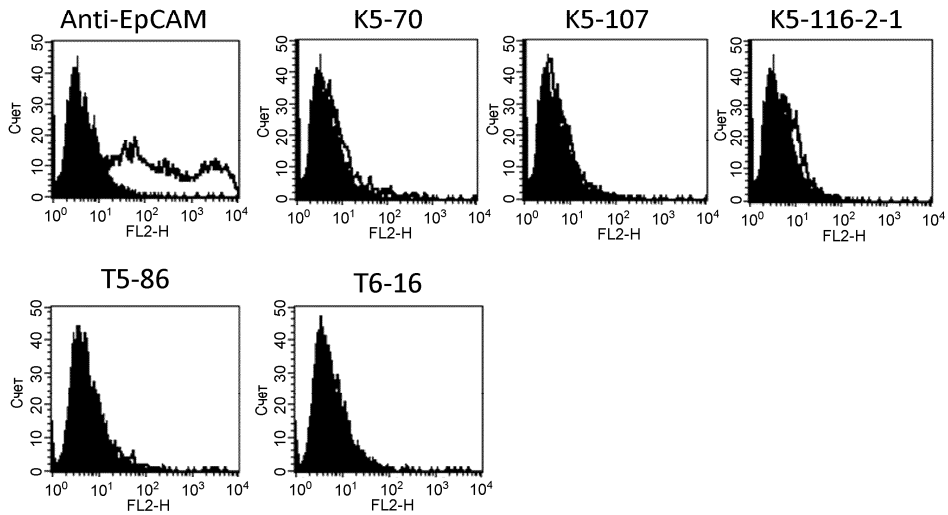


Реактивность по отношению к TROP-2 мыши

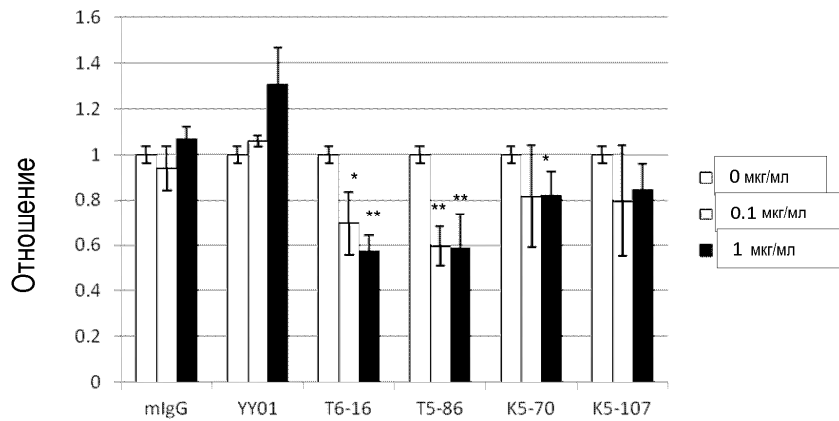


Фиг. 7

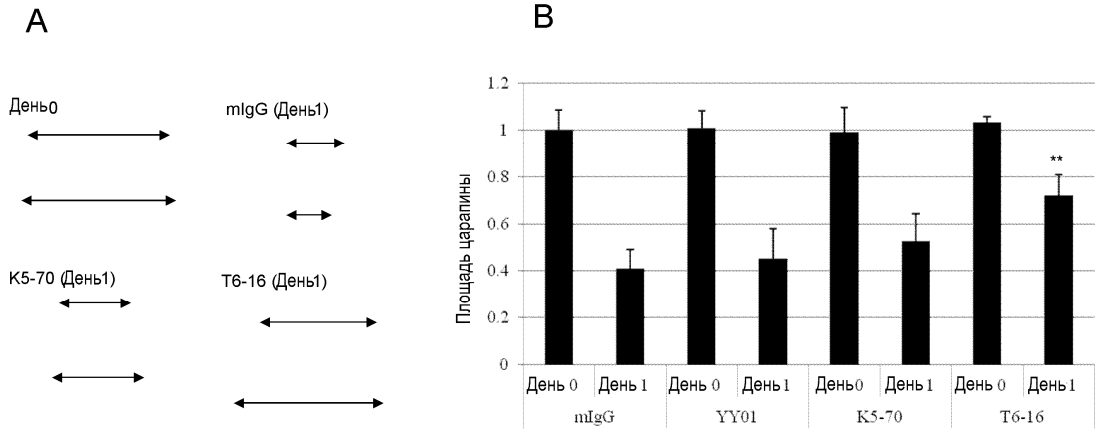
Реактивность по отношению к EpCAM/hTROP-1



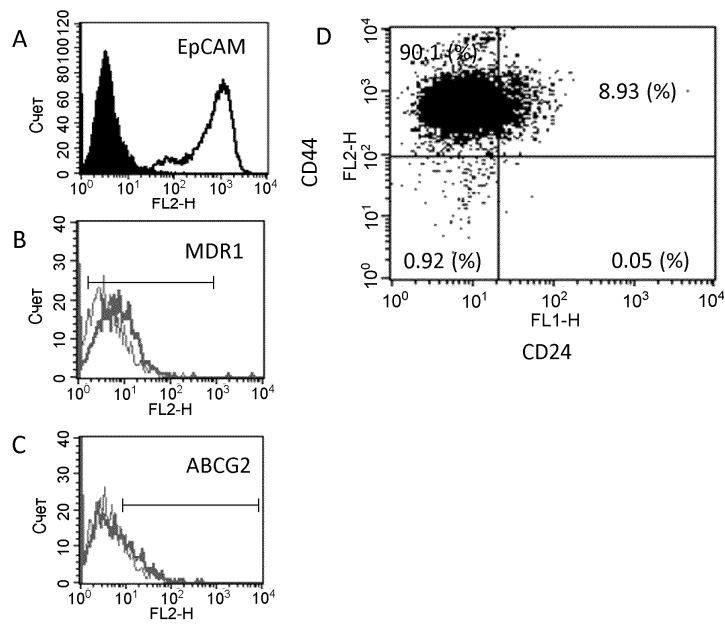
Фиг. 8



Фиг. 9

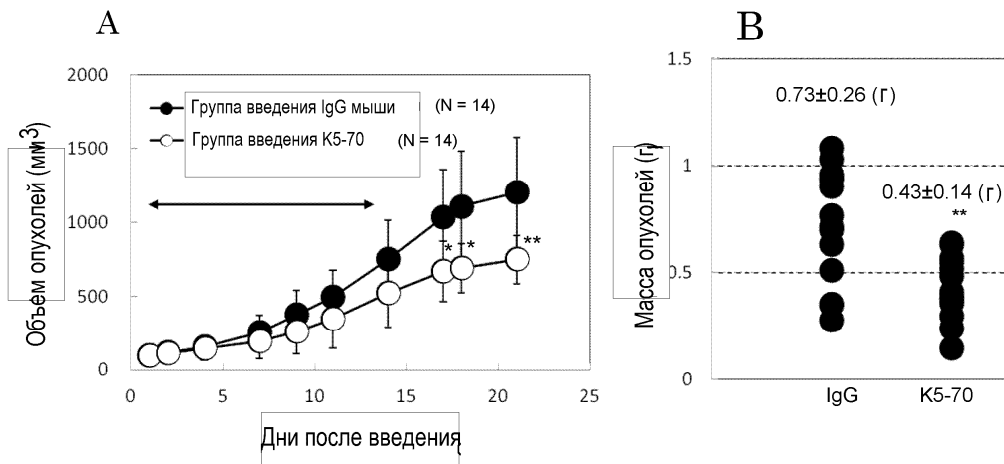


Фиг. 10

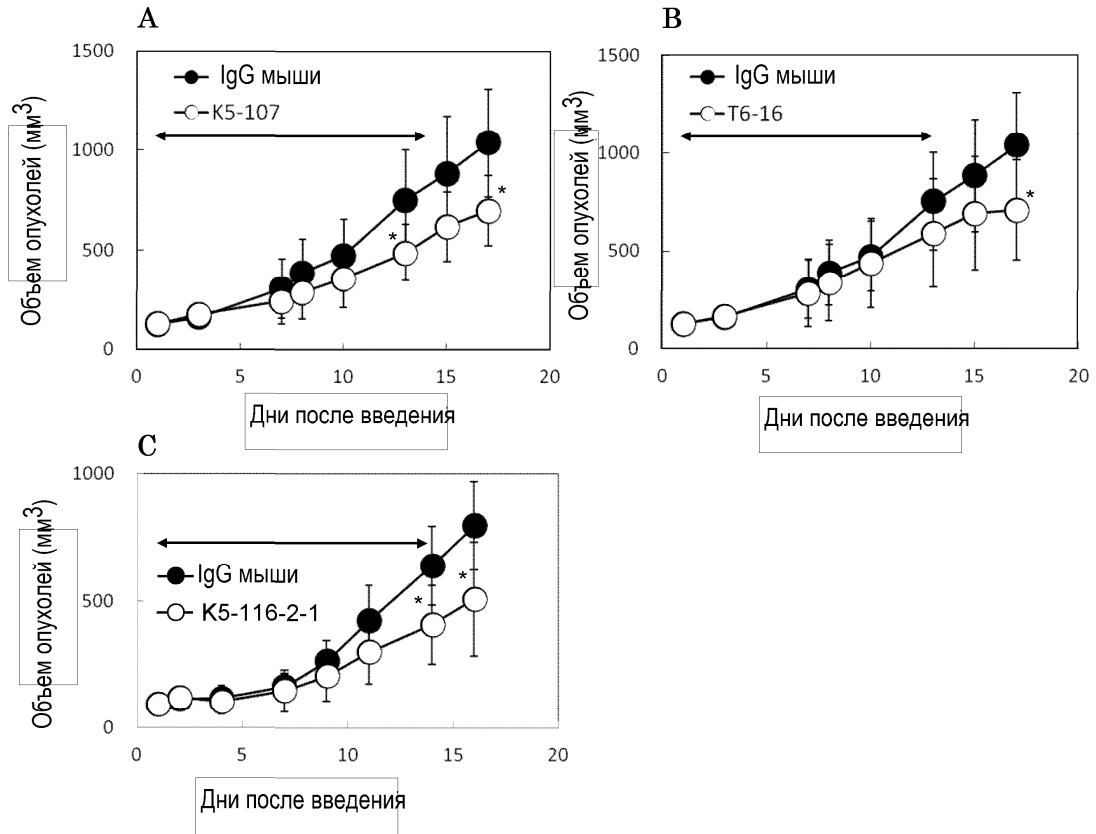


Фиг. 11

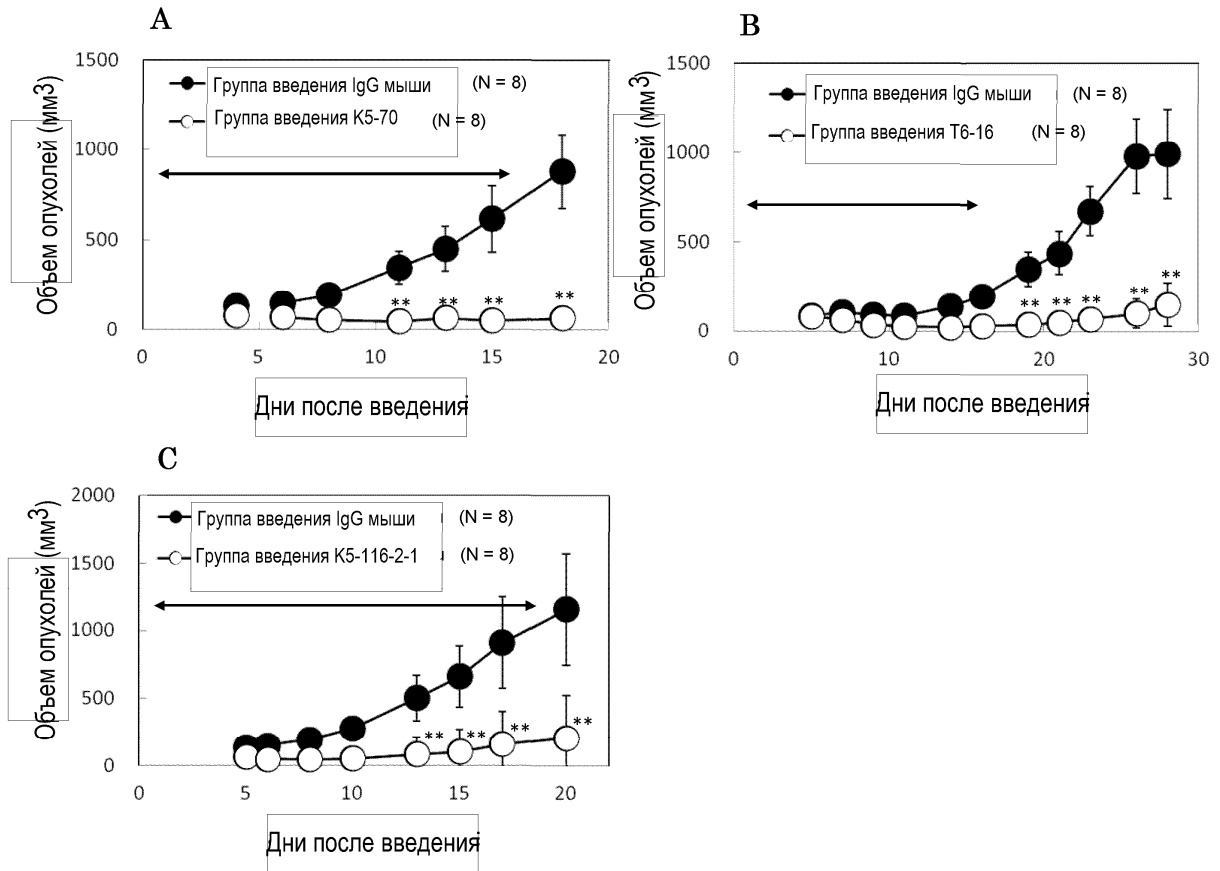
K5-70 / Лечение



Фиг. 12

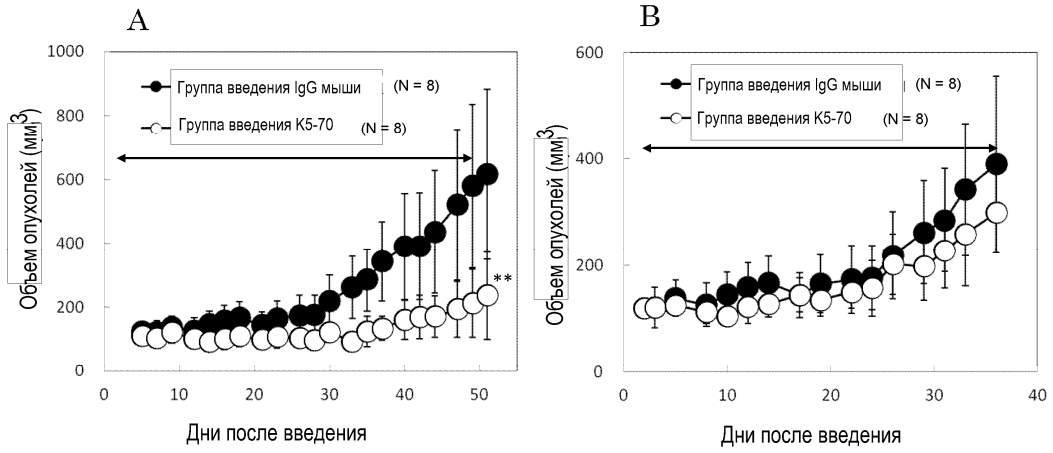


Фиг. 13



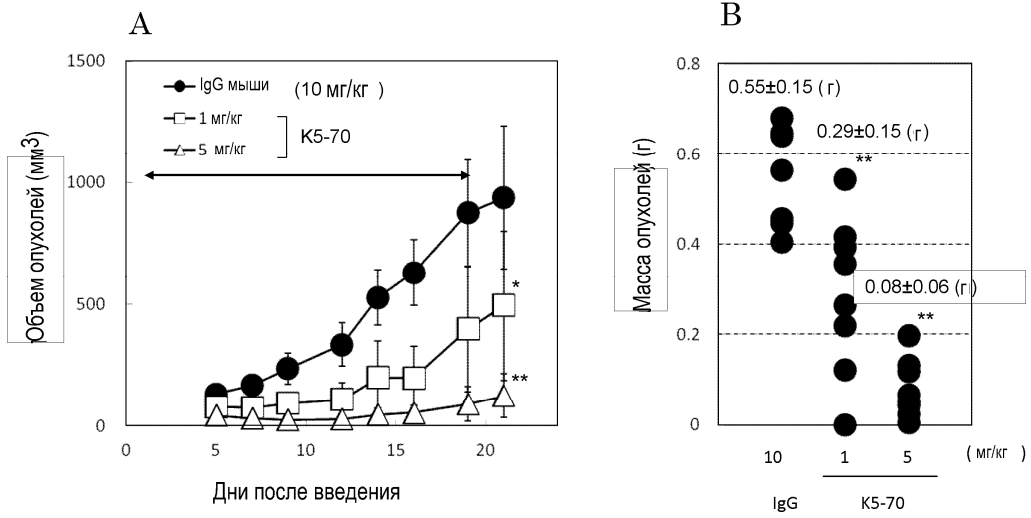
Фиг. 14

K5-70 / ВхРС-3

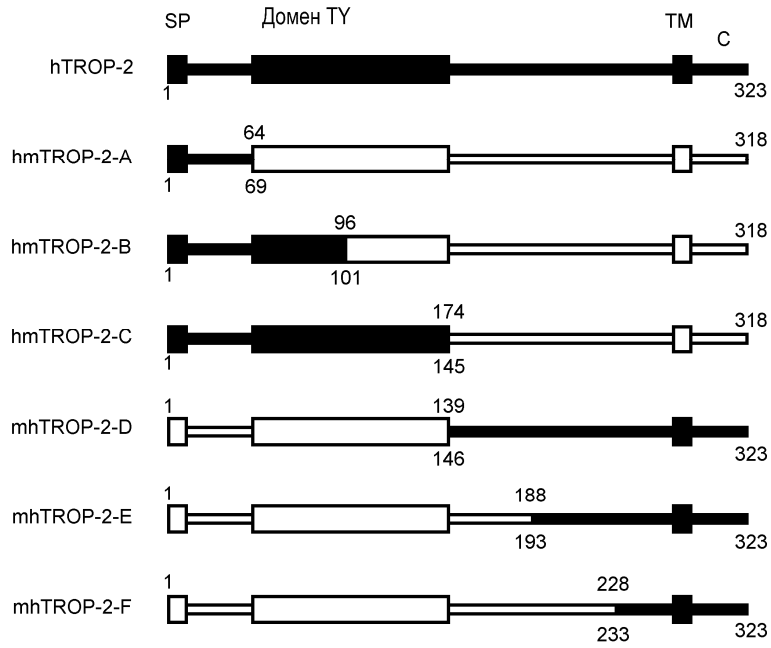


Фиг. 15

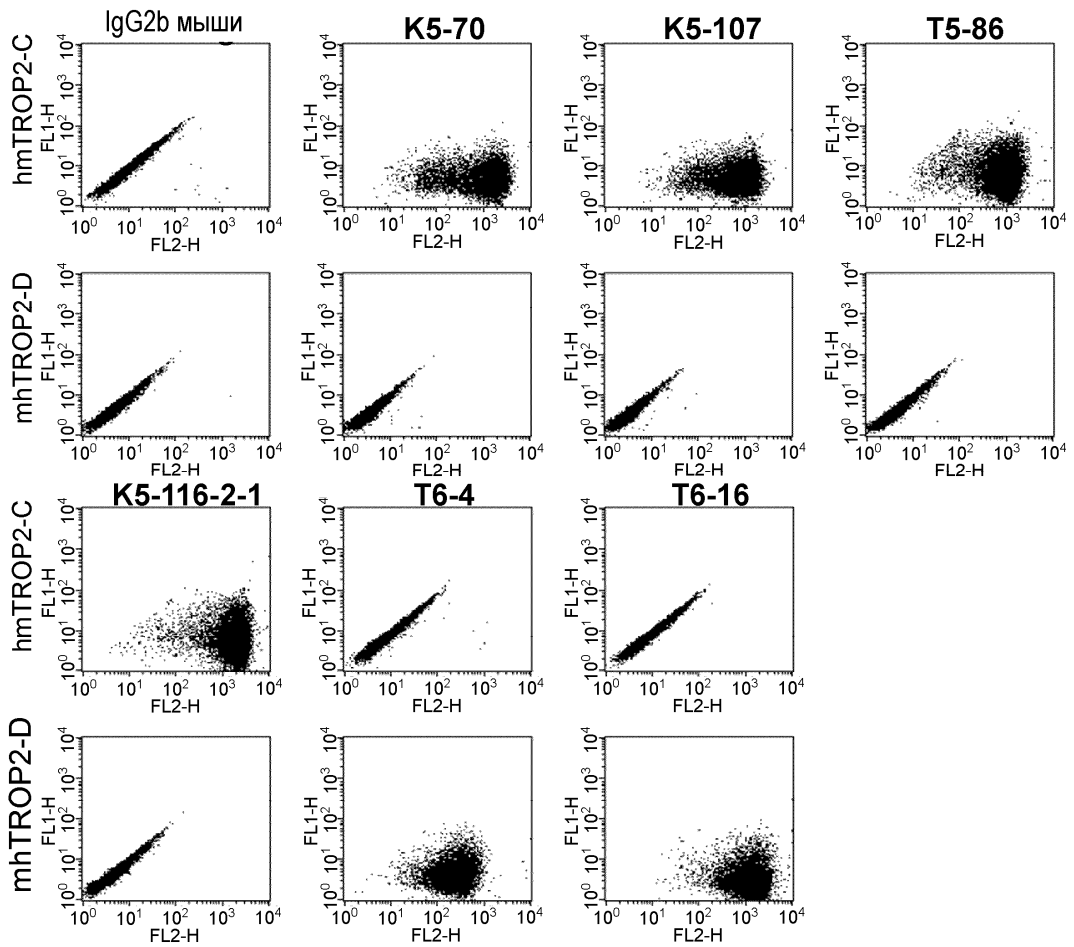
K5-70/ Зависимая от дозы профилактика



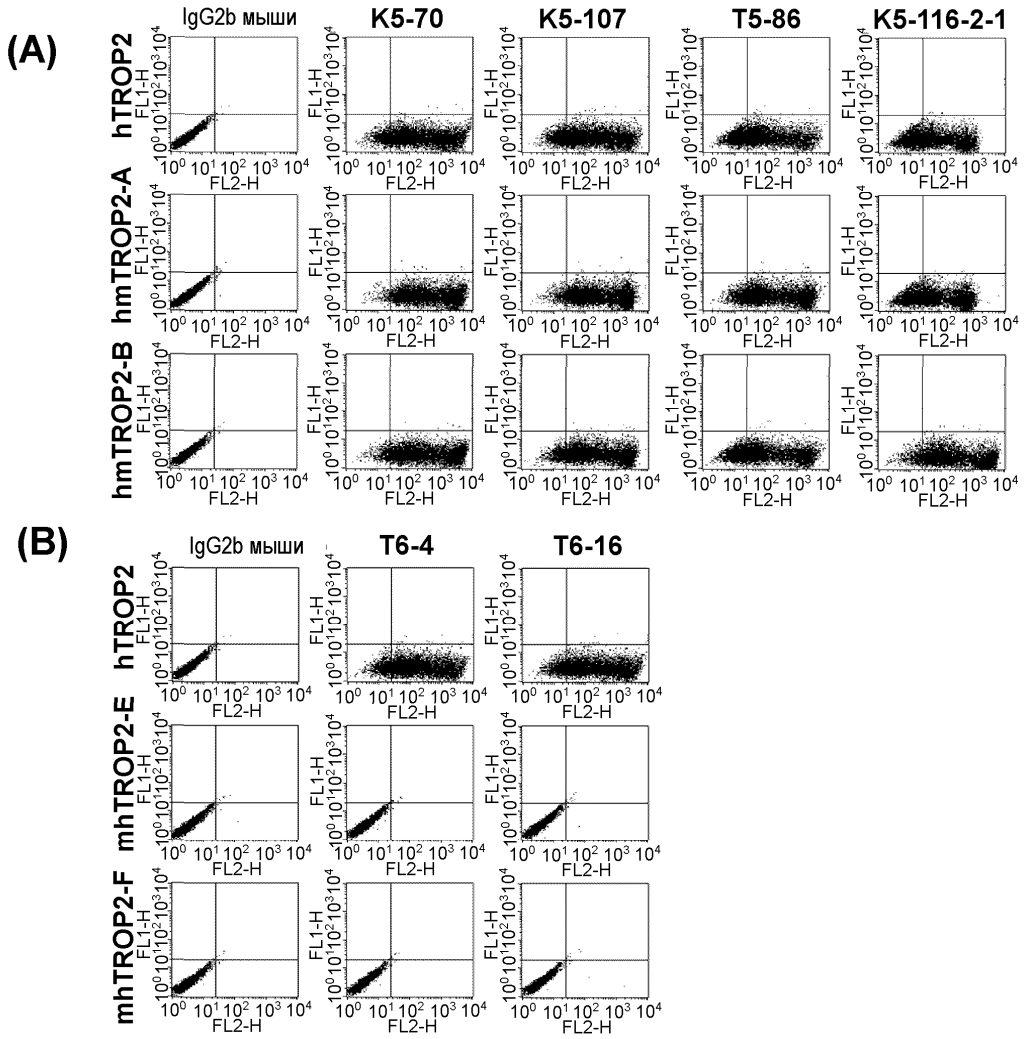
Фиг. 16



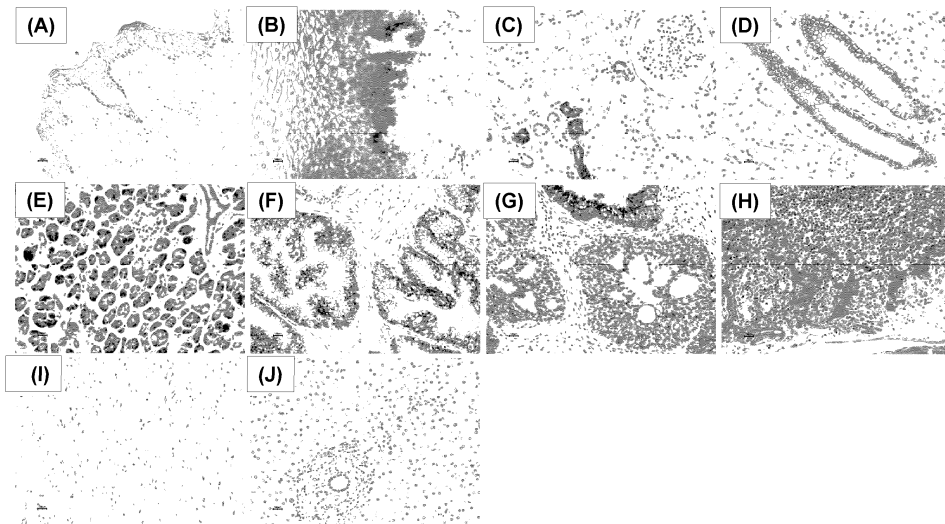
Фиг. 17



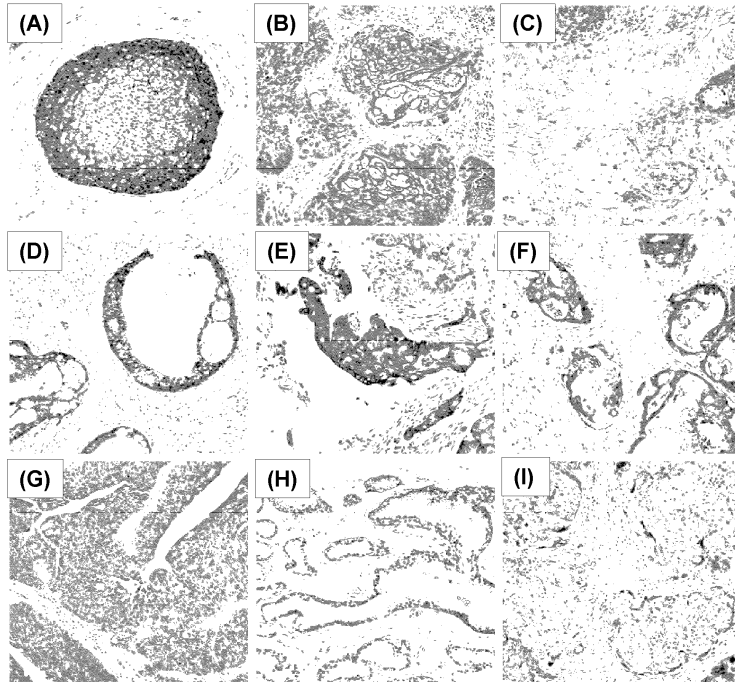
Фиг. 18



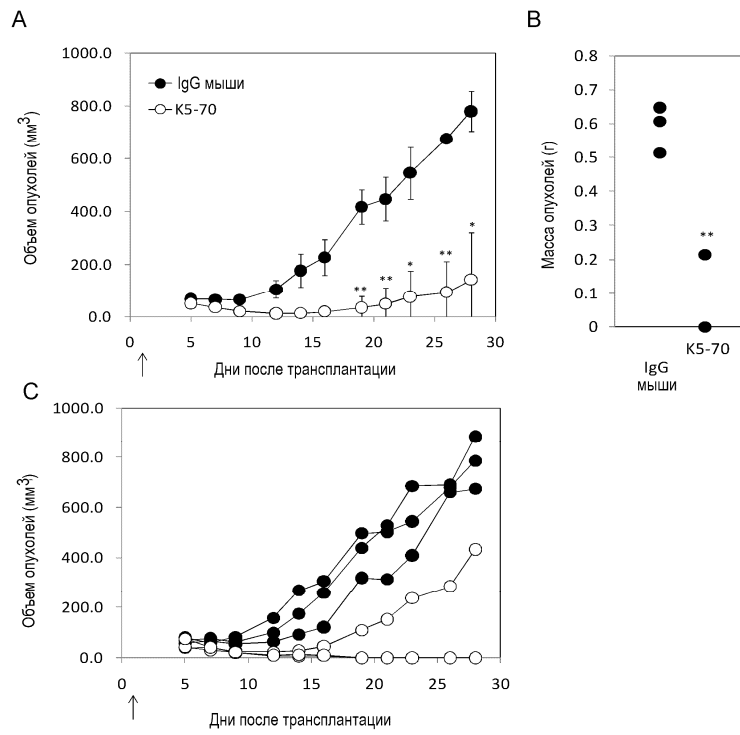
Фиг. 19



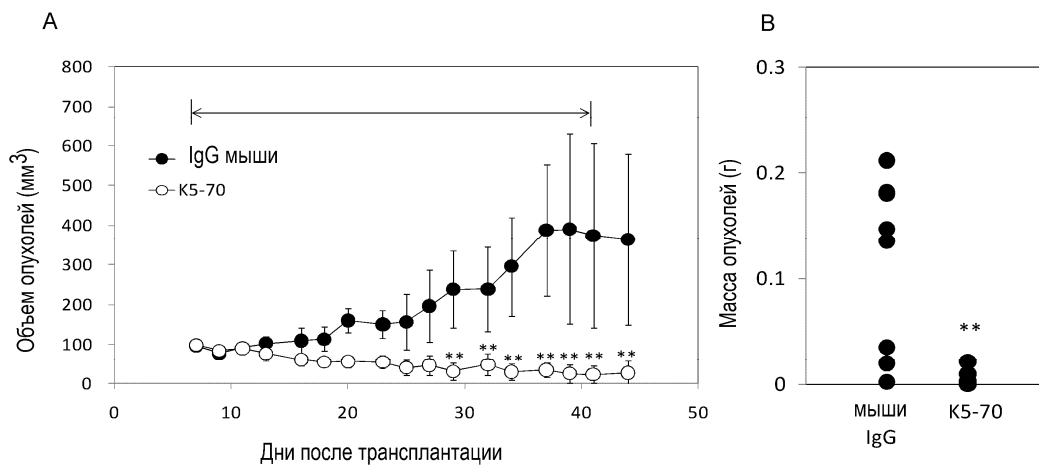
Фиг. 20



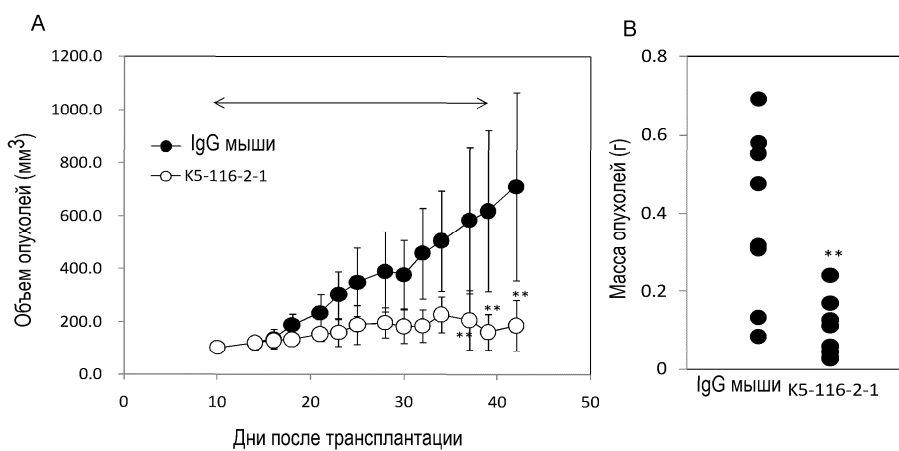
Фиг. 21



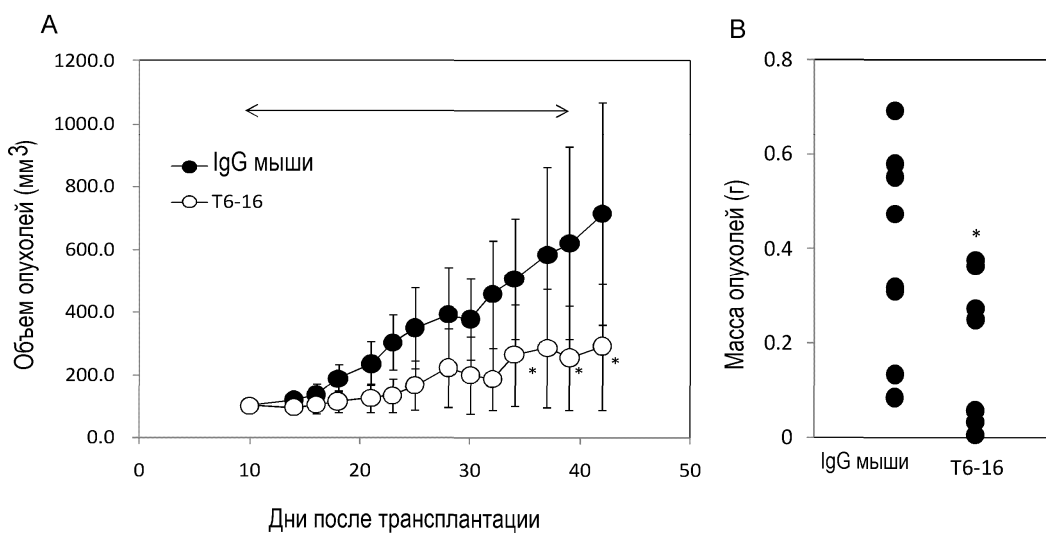
Фиг. 22



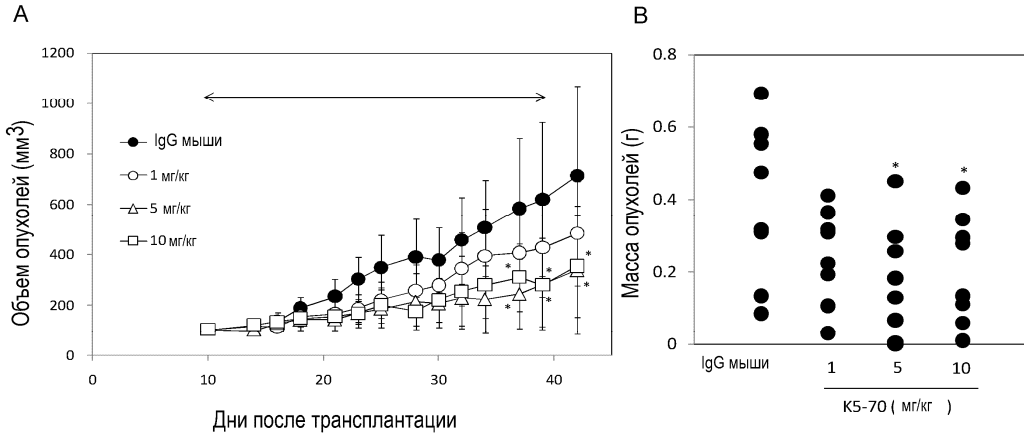
Фиг. 23



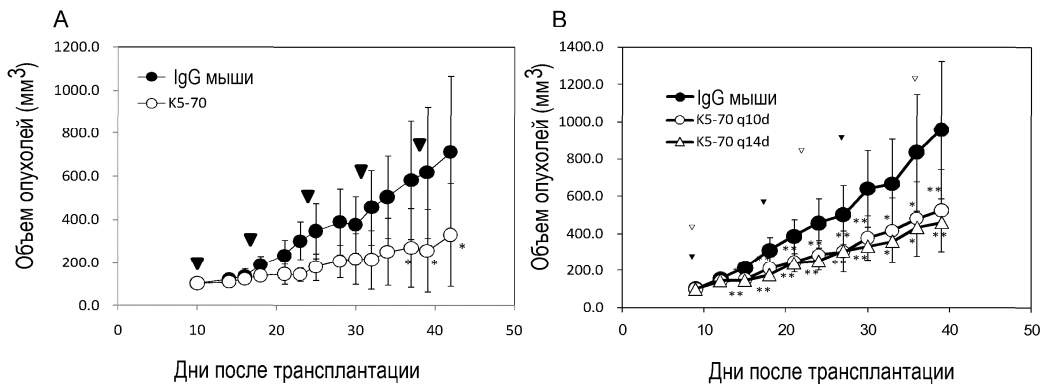
Фиг. 24



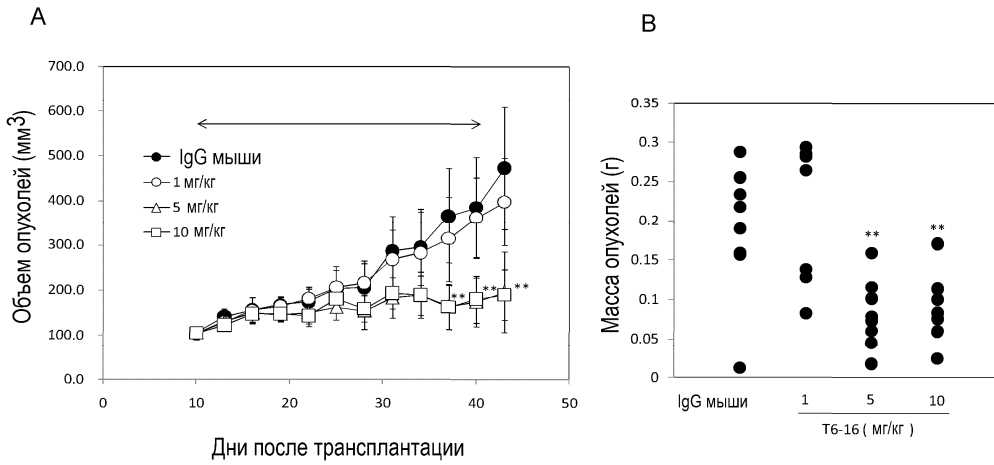
Фиг. 25



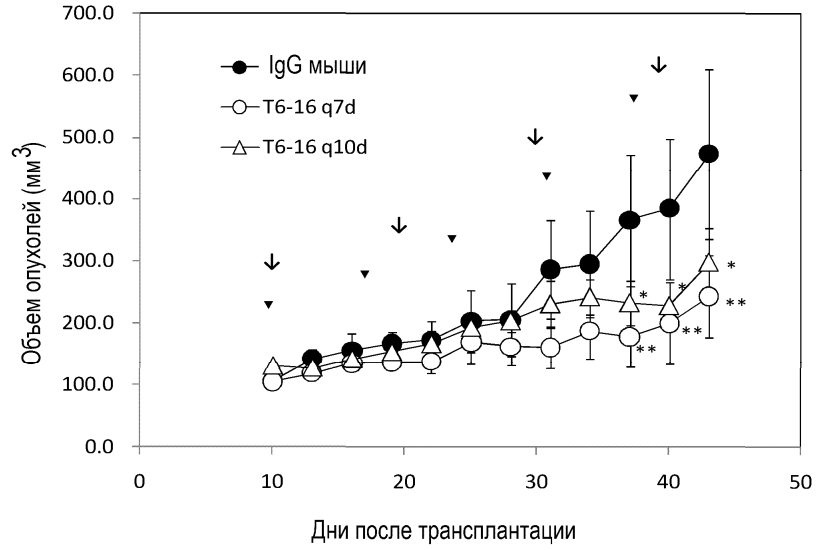
Фиг. 26



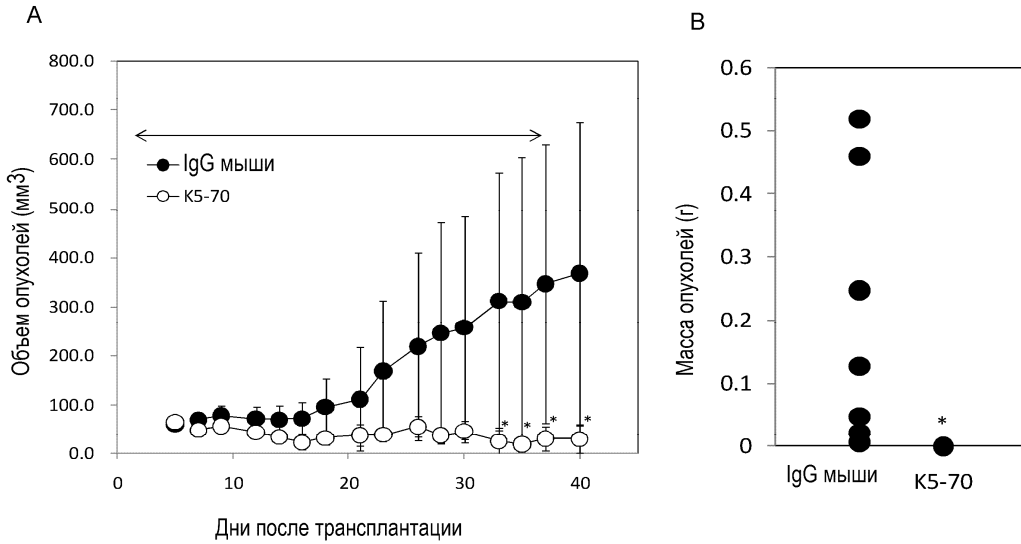
Фиг. 27



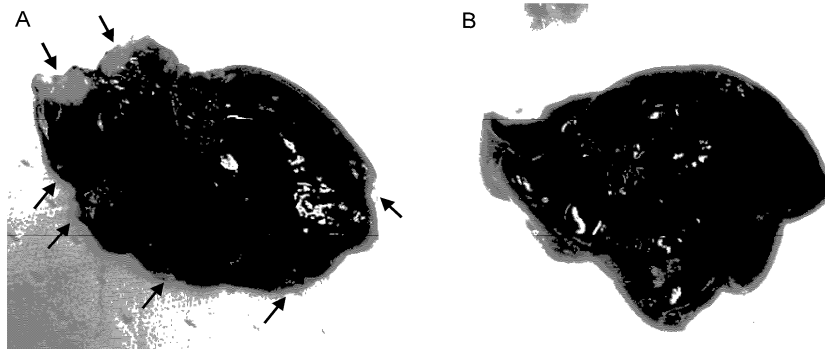
Фиг. 28



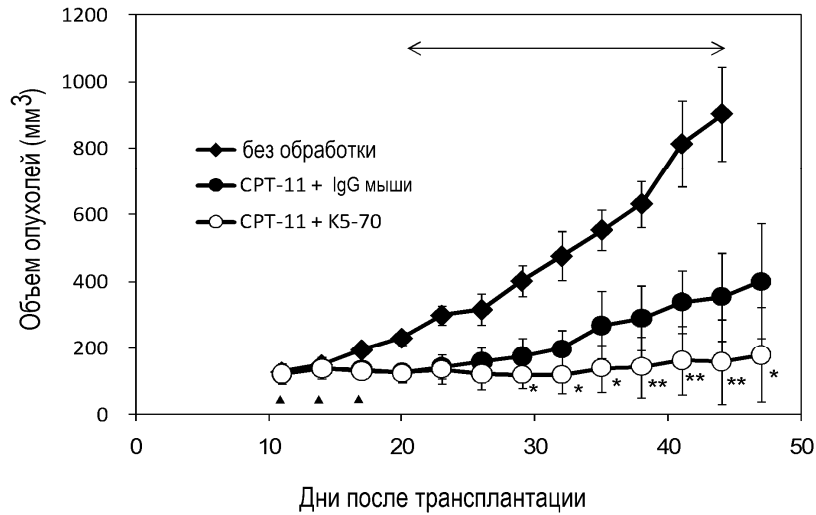
Фиг. 29



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
GTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACSTTCACCATCTACTGGATAAACTGGGTGAAACAGAGGCCT
C K A S G Y T F T I Y W I N W V K Q R P
GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAAT
G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N
CAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
Q K F K D K A T L T V D K S S S T A Y M
CAGCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAACGTCTATG
Q L S S P T S E D S A V Y Y C T R T S M
GCGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
A D Y W G Q G T T L T V S S

Фиг. 33

K5-70
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCSTTGTATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGATCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTTGGCACAAGCATACACTGGTATCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T
AATGGTTTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTGTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTCACGTTCCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGACAAAAGTTGGAAATAAAA
G T K L E I K

Фиг. 34

035947

K5-107
VH

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
GTCCAACCTGCAGCAACCTGGGTCTGAGCTGGTGAGGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G S E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACATTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCAT
C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R H
GGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTTATCCTGGTGGTGGTTATACTAACTACGAT
G Q G L E W I G N I Y P G G G Y T N Y D
GAGAAGTTCAAGAGCAAGGGCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATG
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
TTTACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
F D Y W G Q G T T L T V S S

Фиг. 35

K5-107
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCACT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACTACTGGTTCCAGCAAAGAACA
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
AGGTTTGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
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 F T F G S
GGGACAAAGTTGGAAATAAAA
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
GTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCT
C K A S G Y T F T S Y W I T W V K Q R P
GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAAT
G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N
CAAAAGTTCAGGGACAAGGCCACATGACTGTAGACAAATCCTCCAGTACAGCCTACATG
Q K F R D K A T L T V D K S S S T A Y M
CAGCTCAGCAGCCCACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTTCAGCCCTCTTTGAC
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

035947

K5-116-2-1
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAAGATCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCCAGAGCATTGGCACAAGCATACTGGTATCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T
AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTATTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F I L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTCACGTTCCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAAATAAAA
G T K L E I K

Фиг. 38

T6-16
VH

ATGGGATGGAGCTGGATCTTCTCTTCTCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGCGTCCACTCTGAG
M G W S W I F L F L L S G T A G V H S E
GTCCAGCTTCAGCAGTCCAGGACCTGAGCTGGTGAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATTCC
V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S
TGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTACAATATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCAT
C K A S G Y T F T D Y N M H W V K Q S H
GGAAAGAACCTTGAATGGATGGATATATTTATCCTTACAATGGTGGTACTGGCTACAAC
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
GGTAGTAGCCCTTATGCTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCATCGTCTCC
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

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGCAGTAT
M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D
GTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCTGAGTCTTGGAGATCAGGCCTCCATC
V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
TCTTGCAGATCTAGTCCAGGCTTGTACACGGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTAC
S C R S S Q S L V H G N G N T Y L H W Y
CTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAGTTTCCAACCGATTTTCT
L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S
GGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACGGATTTCACTCAAGATCAGC
G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTCTGCTCTCAAACCTACACATGTTCCACG
R V E A E D L G V Y F C S Q T T H V P T
TTCGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATAAAA
F G S G T K L E I K

Фиг. 40

035947

	1	2	3	4
	123456789	0123456789	0123456789	0123456789
K5-70 VH	QVQLQQPGA	ELVRPGASVK	LSCKASGYTF	TIYWINWVKQ
HuK5-70 VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	TIYWINWVRQ
DA980102 VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	T-----WVRQ
	5	6	7	8
	01223456789	0123456789	0123456789	0122223456789
	a			abc
K5-70 VH	NIYPSDSYTN	NQKFKDKATL	TVDKSSSTAY	MQLSSPTSEDSAV
HuK5-70 VH	NIYPSDSYTN	NQKFKDKATL	TVDTSASTAY	MELSSLRSEDVAV
DA980102 VH	-----	-----RVTL	TSDTSASTAY	MEMSSLRSEDVAV
	1	1		
	9	0	1	
	0123456789	0123456789	0123	
K5-70 VH	YYCTRISMA-	-DYWGQGTTL	TVSS	
HuK5-70 VH	YYCTRISMA-	-DYWGQGTTLV	TVSS	
DA980102 VH	VHYCAR-----	-WGQGTTLV	TVSS	

Фиг. 41

	1	2	3
	123456789	0123456789	0123456789
K5-70 VL	DILLTQSPA	ILSVSPGERV	SFSCRASQSI
HuK5-70 VL	EIVLTQSPA	TLSLSPGERA	TLSCRASQSI
L41174 VL	EIVLTQSPA	TLSLSPGERA	TLSC-----
	4	5	6
	0123456789	0123456789	0123456789
K5-70 VL	TNGSPRLLIK	YASESISGIP	SRFSGSGSGT
HuK5-70 VL	PGQAPRLLIK	YASESISGIP	ARFSGSGSGT
L41174 VL	PGQAPRLLIY	-----GIP	ARFSGSGSGT
	8	9	0
	0123456789	0123456789	01234567
K5-70 VL	SEDIADYYCQ	QSNSWPFTEG	SGTKLEIK
HuK5-70 VL	PEDFAVYYCQ	QSNSWPFTEG	QGTKVEIK
L41174 VL	PEDFAVYYC-	-----FG	QGTKVEIK

Фиг. 42

	1	2	3	4
	123456789	0123456789	0123456789	0123456789
T6-16 VH	EVQLQQSGP	ELVKPGASVK	ISCKASGYTF	TDYNMHWVKQ
HuT6-16 VH1	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	TDYNMHWVRQ
HuT6-16 VH2	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	TDYNMHWVRQ
DA935238 VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	T-----WVRQ
	5	6	7	8
	01223456789	0123456789	0123456789	0122223456789
	a			abc
T6-16 VH	YIYPYNGGTGY	NQRFKSRATM	TVDKSSSTAY	MELRSLTSDSAV
HuT6-16 VH1	YIYPYNGGTGY	NQRFKSRATM	TVDKSTSTAY	MELRSLRSDDTAV
HuT6-16 VH2	YIYPYNGGTGY	NQRFKSRATM	TVDTSTSTAY	MELRSLRSDDTAV
DA935238 VH	-----	-----RVTM	TVDTSTSTAY	MELRSLRSDDTAV
	1	1		
	9	0	1	
	0123456789	00000123456789	0123	
	abcde			
T6-16 VH	YICAREYDGS	SPSYAMYWGQTSV	IVSS	
HuT6-16 VH1	YICAREYDGS	SPSYAMYWGQTMV	TVSS	
HuT6-16 VH2	YICAREYDGS	SPSYAMYWGQTMV	TVSS	
DA935238 VH	YICAR-----	-----WGQTMV	TVSS	

Фиг. 43

	1	2	3
	123456789	0123456789	01234567777789 0123456789
			abcde
T6-16 VL	DVVMQTQPL	SLPVSLGDQA	SISCRSSQSLVHGNG NTYLHWYLQK
HuT6-16 VL	DIVMTQSPL	SLPVTPEGA	SISCRSSQSLVHGNG NTYLHWYLQK
M99608 VL	DIVMTQSPL	SLPVTPEGA	SISC-----WYLQK
	4	5	6 7
	0123456789	0123456789	0123456789 0123456789
T6-16 VL	PGQSPKLLIY	KVSNRFSGVP	DRFSGSGSGT DFTLKISRVE
HuT6-16 VL	PGQSPQLLIY	KVSNRFSGVP	DRFSGSGSGT DFTLKISRVE
M99608 VL	PGQSPQLLIY	-----GVP	DRFSGSGSGT DFTLKISRVE
			1
	8	9	0
	0123456789	0123456789	01234567
T6-16 VL	AEDLGVYFCS	QTHVP-TFG	SGTKLEIK
HuT6-16 VL	AEDVGVYYCS	QTHVP-TFG	GGTKVEIK
M99608 VL	AEDVGVYYC-----	FG	GGTKVEIK

Фиг. 44

HuK5-70
VH

```

GAA TTC ACC ACC ATG GGG TGG AGC TGC ATT AIC CTG TTT CTT GTC GCA ACT GCA ACA GGC
      M G W S C I I L F L V A T A T G
-----
GTI CAC TCA CAG GTI CAG CTA GTC CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAA CCA GGG GCA TCT
V H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S
-----
GTC AAA GTG AGC TGT AAG GCC TCT GGC TAT ACG TTC ACG ATA TAC TGG ATC AAT TGG GTG
V K V S C K A S G Y T F T I Y W I N W V
-----
AGG CAA GCT CCT GGA CAA CGG TTG GAA TGG ATT GGC AAC ATC TAT CCC TCA GAC TCC TAC
R Q A P G Q R L E W I G N I Y F S D S Y
-----
ACC AAC TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC AAA GCC ACT CTC ACC GTA GAT ACC AGT GCC TCC
I N Y N Q K F K D K A T L T V D T S A S
-----
ACA GCC TAT ATG GAG CTG AGC AGT TTA CGC AGC GAA GAT ACA GCG GTG TAC TAC TGC ACC
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C T
-----
AGA ACC TCC ATG GCT GAC TAT TGG GGT CAG GGT ACA CTG GTG ACT GTG AGC TCC GCT AGC
R I S M A D Y W G Q G T L V T V S S

```

Фиг. 45

HuK5-70
VL

```

ACC GGT ACC ACC ATG GTA AGC ACA CCC CAG TTC CTC GTT TTC CTC CTG TTT TGG ATT CCC
      M V S T F Q F L V F L L F W I F
-----
GCA AGT AGA GGG GAG ATC GTC TTG ACT CAG AGT CCT GCC ACA CTG TCT CTT TCA CCA GGA
A S R G E I V L T Q S F A T L S L S F G
-----
GAA AGG GCG ACA CTT AGC TGT CGA GCT TCT CAG AGC ATT GGC ACG TCC ATA CAC TGG TAT
E R A T L S C R A S Q S I G T S I H W Y
-----
CAG CAG AAA CCG GGA CAA GCT CCA CGG TTA CTG AIC AAG TAT GCC TCC GAA AGC AIC TCT
Q Q K P G Q A P R L L I K Y A S E S I S
-----
GGG AIT CCT GCA CGC TIT AGC GGA AGC GGT AGT GGT ACC GAC TTC ACT CTG ACC ATA TCC
G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S
-----
TCA CTA GAA CCC GAG GAT TTT GCC GTG TAC TAC TGC CAG TCC AAC TCA TGG CCT TTC
S L E P E D F A V Y Y C Q Q S N S W F F
-----
ACC TTT GGC CAA GGC ACC AAA GTG GAG ATC AAG CGT ACG
I F G Q G I K V E I K

```

Фиг. 46

035947

HuT6-16
VH1

```
GAA TTC ACC ACC ATG GGA TGG TCT TGG ATC TTT CTC TTC CTG CTG TCT GGC ACA GCT GGA
      M G W S W I F L F L L S G T A G
-----
GTC CAT TCC CAA GTT CAG CTG GTC CAG TCC GGA GCT GAA GTT AAA AAG CCC GGG GCC AGC
V H S Q V Q L V Q S G A E V K K F G A S
-----
GTC AAA GTC TCC TGC AAG GCA TCC GGG TAT ACT TTT ACC GAT TAT AAC ATG CAC TGG GTG
V K V S C K A S G Y T F T D Y N M H W V
-----
CGC CAA GCA CCC GGC CAG GGC CTG GAG TGG ATT GGC TAT ATC TAT CCT TAT AAT GGA GGG
R Q A F G Q G L E W I G Y I Y F Y N G G
-----
ACC GGC TAC AAC CAG AGA TTC AAG AGC AGA GCC ACC ATG ACA GTG GAT AAA TCT ACC AGC
I G Y N Q R F K S R A T M T V D K S T S
-----
ACT GCC TAC ATG GAG CTG AGA AGC CTG CGG AGC GAC GAC ACA GCC GTG TAC TAC TGT GCC
T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A
-----
CGC GAG GAT TAC GGA AGC AGC CCA AGC TAC GCC ATG GAT TAC TGG GGC CAA GGC ACT ATG
R E D Y G S S F S Y A M D Y W G Q G T M
-----
GTC ACC GTG AGC AGC GCT AGC
V I V S S 
```

Фиг. 47

HuT6-16
VH2

```
GAA TTC ACC ACC ATG GGC TGG TCT TGG ATC TTC CTC TTC CTG CTG AGC GGG ACC GCT GGA
      M G W S W I F L F L L S G T A G
-----
GTC CAT TCT CAA GTC CAA CTG GTC CAG TCC GGG GCT GAA GTG AAA AAA CCA GGA GCA TCC
V H S Q V Q L V Q S G A E V K K F G A S
-----
GTT AAG GTG TCC TGT AAG GCA AGC GGA TAC ACC TTT ACC GAC TAT AAC ATG CAC TGG GTG
V K V S C K A S G Y T F T D Y N M H W V
-----
AGG CAG GCC CCC GGA CAG GGG CTG GAG TGG ATC GGC TAT ATT TAT CCT TAC AAC GGG GGC
R Q A F G Q G L E W I G Y I Y F Y N G G
-----
ACT GGC TAT AAT CAG AGA TTT AAG AGC CGC GCT ACC ATG ACC GTG GAC ACC TCC ACT TCT
I G Y N Q R F K S R A T M T V D T S T S
-----
ACA GCC TAT ATG GAG CTG AGA AGC CTG CGG AGC GAT GAT ACA GCC GTG TAC TAC TGC GCC
T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A
-----
AGA GAA GAT TAC GGC AGC AGC CCC AGC TAC GCC ATG GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACA ATG
R E D Y G S S F S Y A M D Y W G Q G T M
-----
GTT ACT GTG AGC AGC GCT AGC
V I V S S 
```

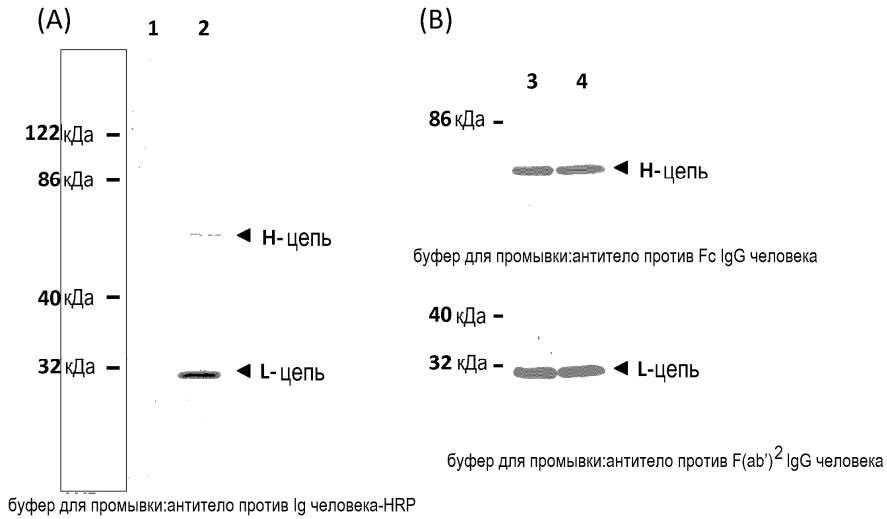
Фиг. 48

035947

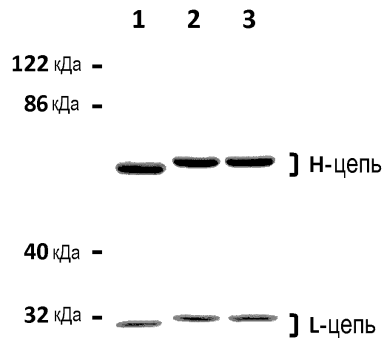
HuT6-16
VL

```
ACC GGT ACC ACC ATG AAG CTC CCA GTG CGC CTC CTG GTC CTG ATG TTC TGG ATT CCC GCT
      M  K  L  P  V  R  L  L  V  L  M  F  W  I  P  A
-----
TCC TCT AGC GAT ATC GTC ATG ACC CAA TCC CCA CTG TCT CTG CCT GTG ACA CCA GGC GAA
      S  S  S  D  I  V  M  T  Q  S  P  L  S  L  P  V  I  P  G  E
-----
CCT GCA TCT ATT AGC TGT AGA AGC AGC CAG TCC CTG GTG CAC GGA AAC GGA AAC ACC TAT
      P  A  S  I  S  C  R  S  S  Q  S  L  V  H  G  N  G  N  I  Y
-----
CTG CAC TGG TAC CTG CAA AAA CCT GGA CAG AGC CCC CAG CTG CTG ATC TAC AAA GTC AGC
      L  H  W  Y  L  Q  K  P  G  Q  S  P  Q  L  L  I  Y  K  V  S
-----
AAT AGA TTT AGC GGG GTG CCC GAC AGG TTT AGC GGC AGC GGC AGC GGC ACA GAT TTC ACC
      N  R  F  S  G  V  P  D  R  F  S  G  S  G  S  G  I  D  F  T
-----
CTG AAA ATC TCC CGG GTG GAA GCC GAG GAC GTT GGG GTT TAC TAT TGC AGC CAG ACA ACC
      L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  V  G  V  Y  Y  C  S  Q  I  T
-----
CAT GTG CCC ACT TTC GGG GGC GGC ACT AAG GTG GAG ATC AAG CGT ACG
      H  V  P  I  F  G  G  G  I  K  V  E  I  K  [ ]
```

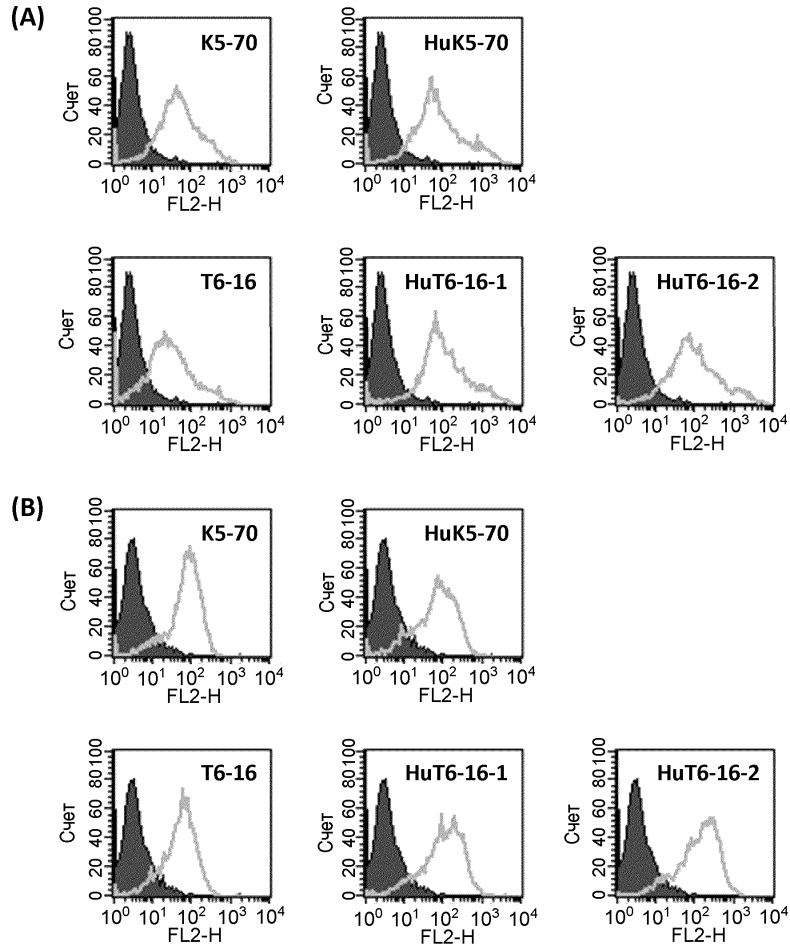
Фиг. 49



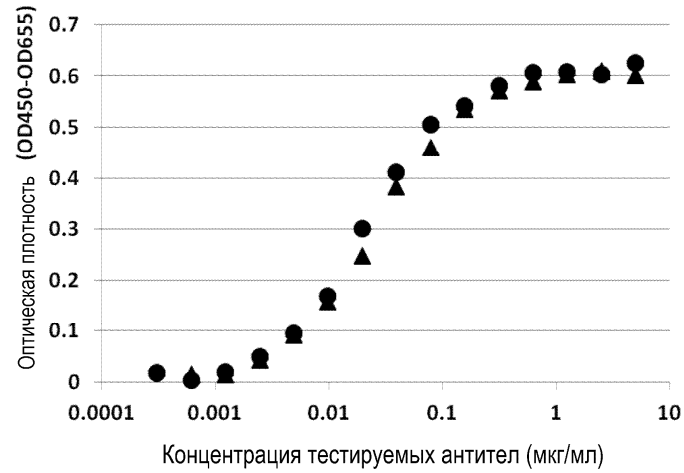
Фиг. 50



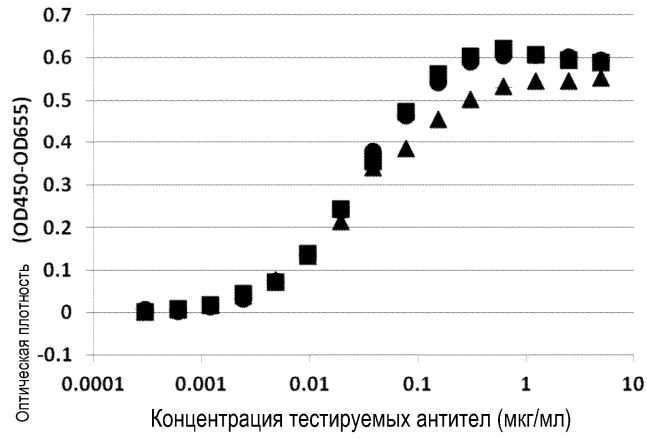
Фиг. 51



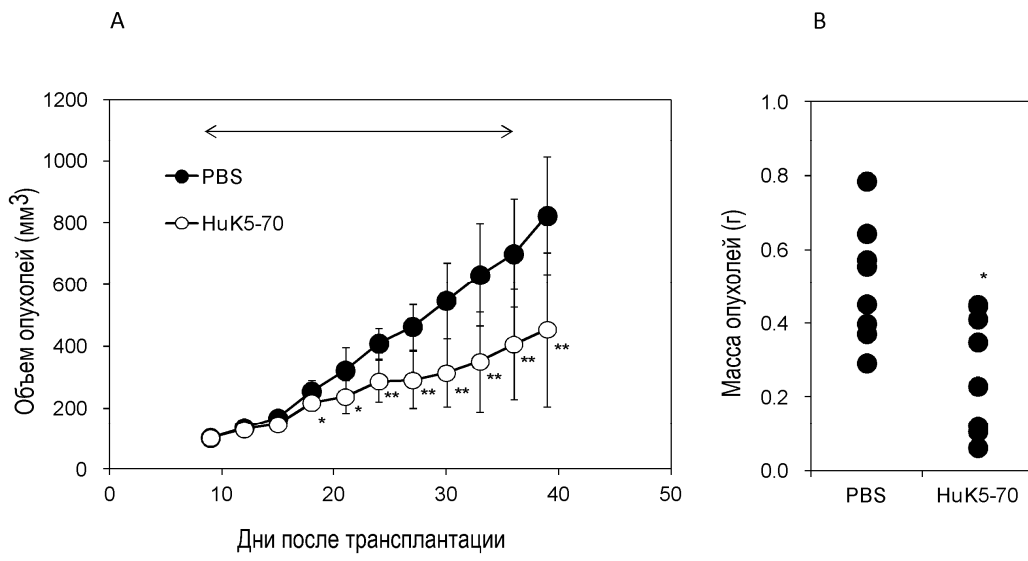
Фиг. 52



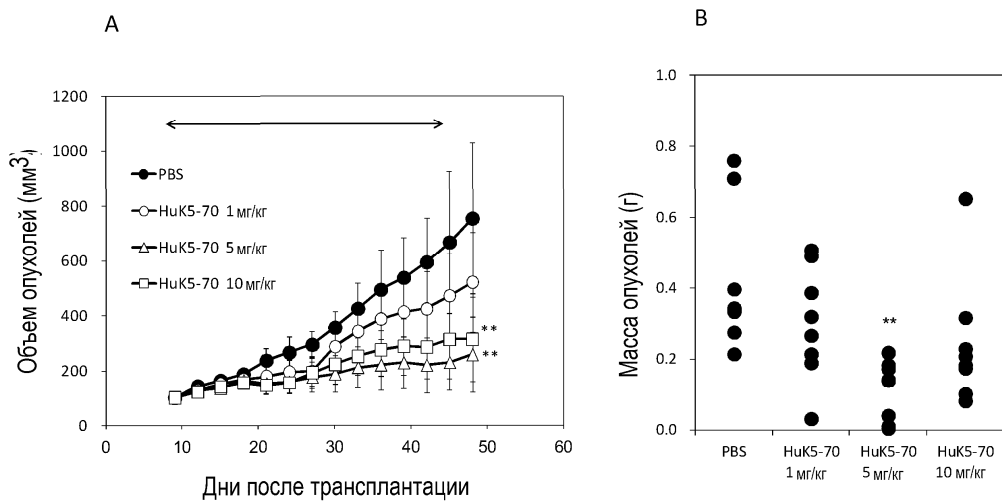
Фиг. 53



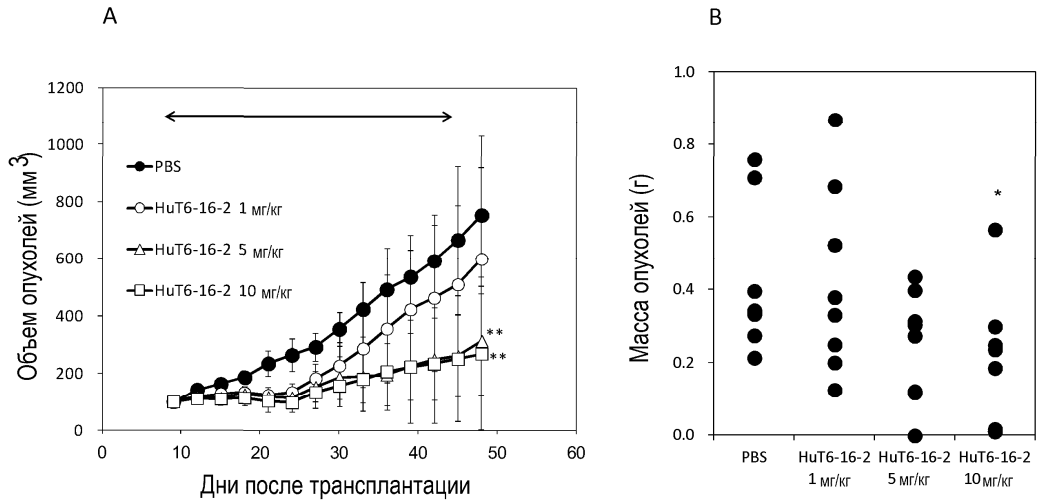
Фиг. 54



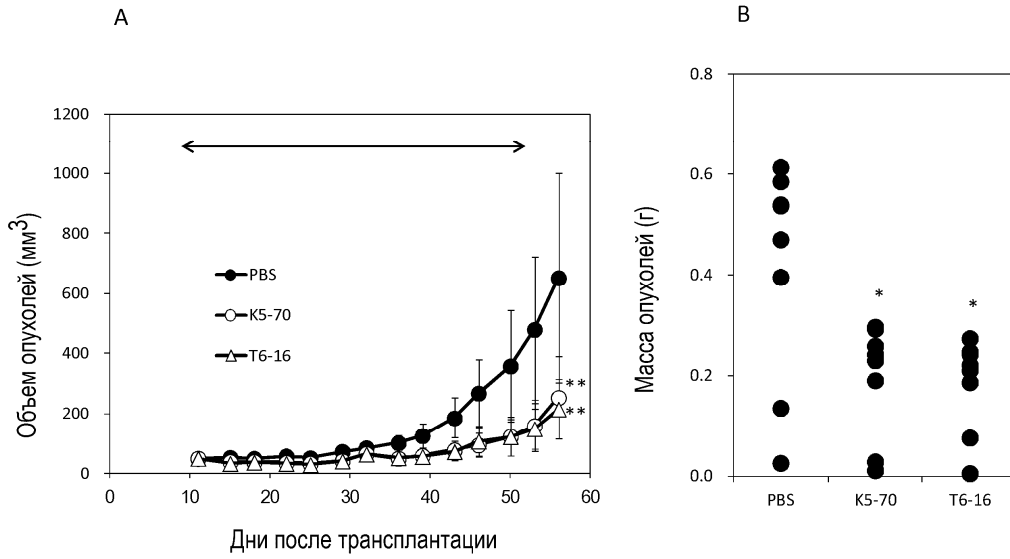
Фиг. 55



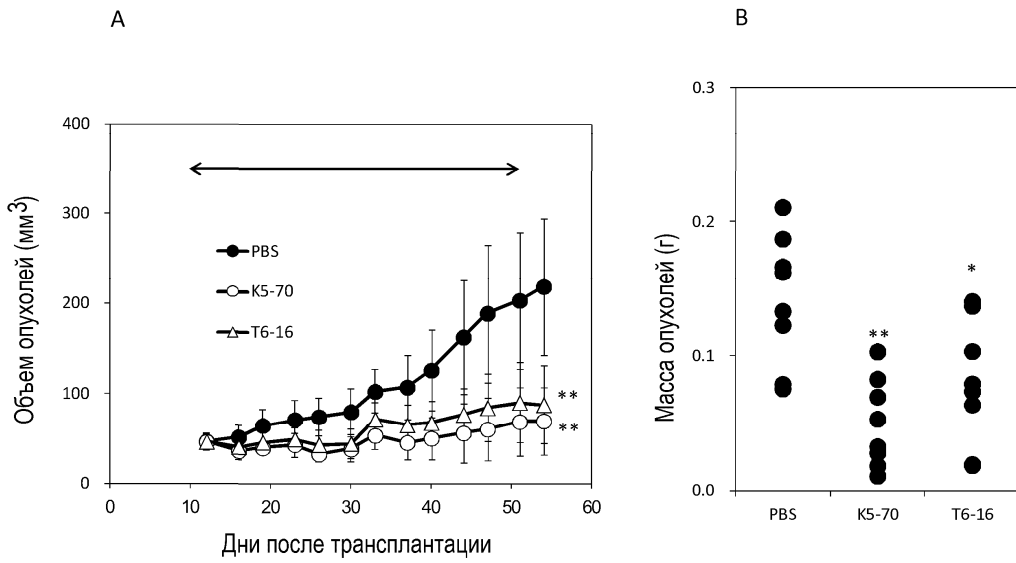
Фиг. 56



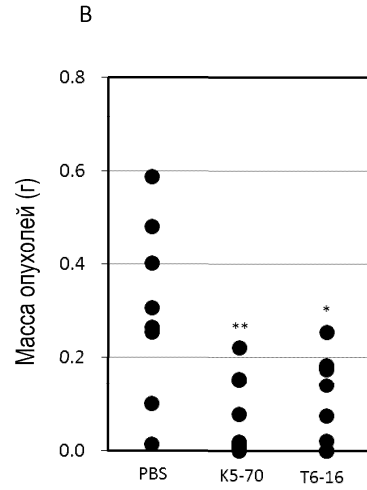
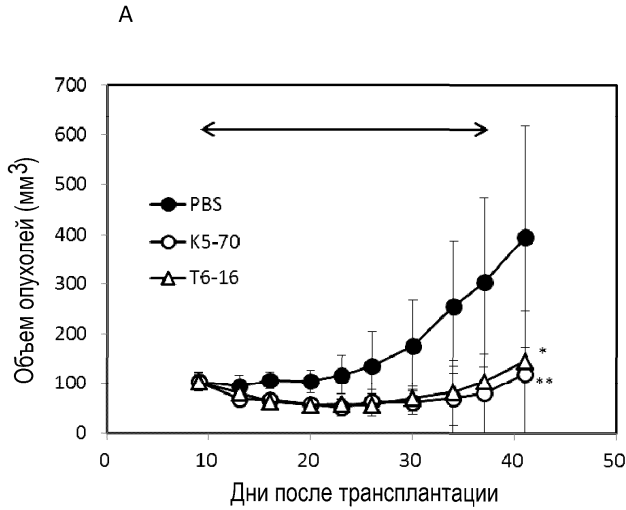
Фиг. 57



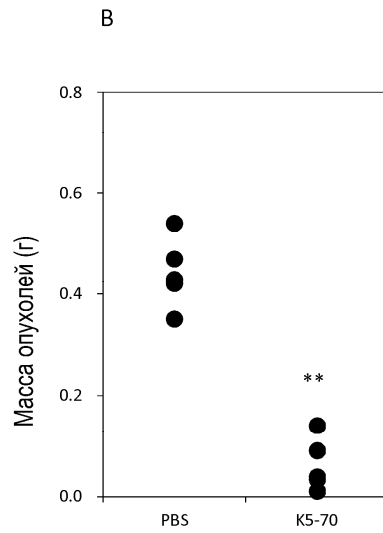
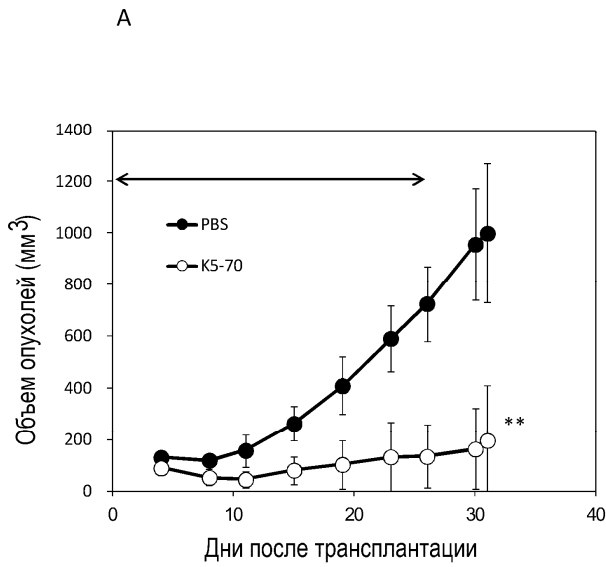
Фиг. 58



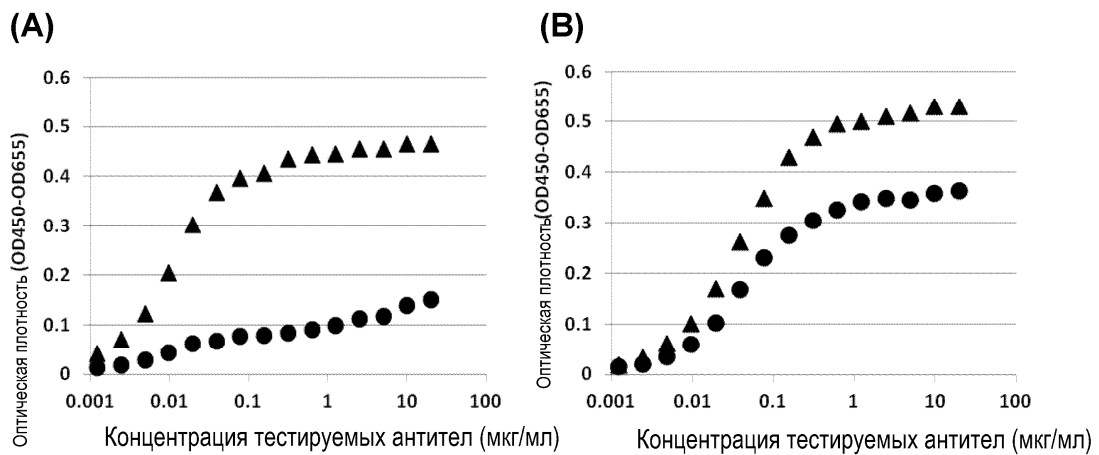
Фиг. 59



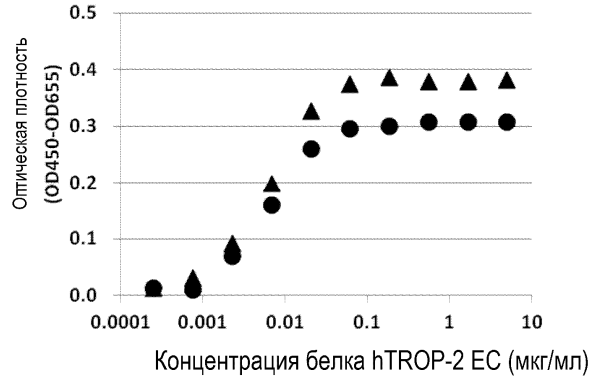
Фиг. 60



Фиг. 61



Фиг. 62



Фиг. 63

EcoRI Kozak
GAA TTC ACC ACC ATG GGA TGG TCC TGC ATT ATT CTC TTT CTC GTC GCC ACC GCC ACA GGC
M G W S C I I L F L V A T A T G

GTG CAC AGC CAG GTT CAA CTG CAG CAA CCT GGG GCA GAG CTG GTT CGG CCA GGG GCC TCC
V H S Q V Q L Q Q P G A E L V R P G A S

GTC AAA CTG TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC ACT TTC ACC ATC TAC TGG ATC AAC TGG GTG
V K L S C K A S G Y T F T I Y W I N W V

AAG CAG AGG CCC GGC CAG GGC CTG GAA TGG ATC GGA AAT ATC TAT CCT AGC GAT TCT TAC
K Q R P G Q G L E W I G N I Y P S D S Y

ACA AAT TAC AAC CAG AAG TTC AAG GAC AAG GCT ACC CTG ACC GTG GAC AAA TCT AGC TCC
T N Y N Q K F K D K A T L T V D K S S S

ACA GCC TAC ATG CAG CTG AGC AGC CCC ACT AGC GAG GAT AGC GCA GTG TAT TAT TGT ACC
T A Y M Q L S S P T S E D S A V Y Y C T

AGA ACC AGC ATG GCC GAC TAT TGG GGA CAG GGC ACA ACT CTG ACC GTG AGC AGC GCT AGC
R T S M A D Y W G Q G T T L T V S S

NheI

Фиг. 64

AgeI Kozak
ACC GGT ACC ACC ATG GTT AGC ACA CCT CAA TTT CTG GTC TTC CTG CTC TTC TGG ATT CCT
M V S T P Q F L V F L L F W I P

GCC AGC AGA GGA GAT ATC CTC CTG ACA CAA AGC CCC GCA ATC CTG AGC GTG TCC CCC GGA
A S R G D I L L T Q S P A I L S V S P G

GAG CGC GTG AGC TTT AGC TGC CGG GCC AGC CAG AGC ATT GGA ACC AGC ATC CAC TGG TAT
E R V S F S C R A S Q S I G T S I H W Y

CAG CAG AGA ACC AAC GGG TCT CCC AGG CTG CTG ATT AAA TAC GCT TCT GAG TCT ATT TCC
Q Q R T N G S P R L L I K Y A S E S I S

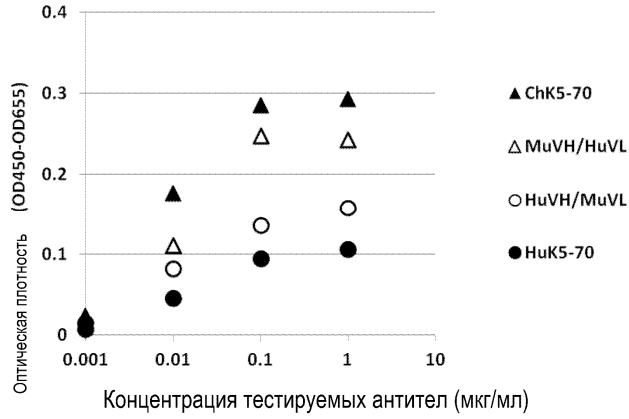
GGG ATC CCA AGC AGA TTC TCC GGC TCT GGC AGC GGC ACT GAT TTT ACT CTG TCT ATC AAC
G I P S R F S G S G S G T D F T L S I N

AGC GTG GAG TCC GAA GAC ATC GCC GAC TAC TAT TGT CAG CAG AGC AAT TCC TGG CCA TTC
S V E S E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F

BsiWI

T F G S G T K L E I K CGT ACG

Фиг. 65

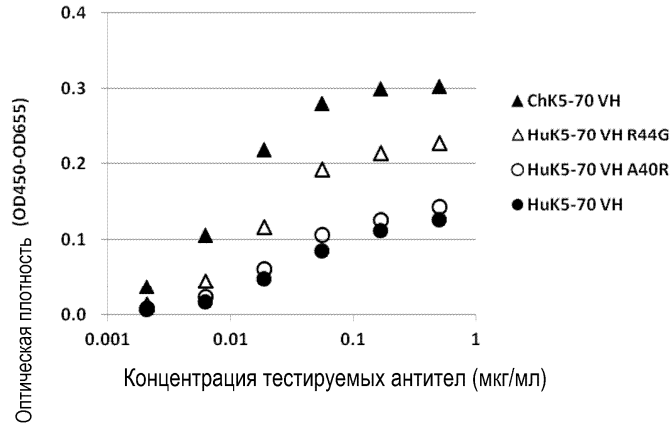


Фиг. 66

	1		2		3		4		5	
	123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
HuK5-70 VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	TIYWINWVRQ	APGQRLEWIG	NIYPSDSYTN				
V5Q	---Q---									
S7P	-----P-----									
V11L	-----L-----									
K12V	-----V-----									
K13R	-----R-----									
V20L			L-----							
R38K							-----K-----			
A40R							-----R-----			
R44G							-----G-----			
T73K										
A75S										
E81Q										
L82cP										
R83T										
T87S										
L108T										
V109L										
V11L/R38K	-----L-----						-----K-----			

	6		7		8		9		10	
	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
HuK5-70 VH	NQKFKDKATL	TVDTSASTAY	MELSSLRSED	TAV	YYCTRTSMA-	-DYWGQGLV	TVSS			
V5Q										
S7P										
V11L										
K12V										
K13R										
V20L										
R38K										
A40R										
R44G										
T73K										
A75S										
E81Q										
L82cP										
R83T										
T87S										
L108T										
V109L										
V11L/R38K										

Фиг. 67



Фиг. 68

```

EcoRI      Kozak
GAA TTC  ACC ACC  ATG GGC TGG AGC TGT ATT ATT CTC TTC CTC GTC GCC ACT GCA ACC GGG
           M  G  W  S  C  I  I  L  F  L  V  A  T  A  T  G

GTC CAC TCC CAG GTC CAG CTG GTG CAG AGC GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCC GGC GCC AGC
V  H  S  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

GTT AAG GTT TCT TGC AAA GCC TCT GGC TAT ACA TTC ACA ATC TAT TGG ATC AAT TGG GTG
V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  I  Y  W  I  N  W  V

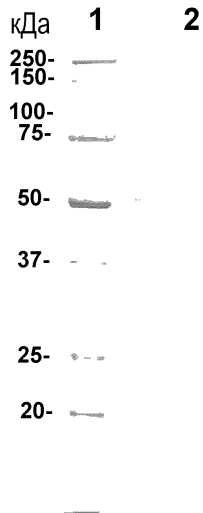
CGG CAG GCT CCA GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGC AAT ATC TAT CCT TCC GAC TCC TAC
R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  N  I  Y  P  S  D  S  Y

ACC AAC TAT AAC CAG AAA TTT AAG GAC AAA GCA ACA CTG ACC GTG GAC ACC TCT GCC AGC
T  N  Y  N  Q  K  F  K  D  K  A  T  L  T  V  D  T  S  A  S

ACT GCT TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA AGC GAA GAT ACT GCC GTG TAC TAC TGC ACC
T  A  Y  M  E  L  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  T

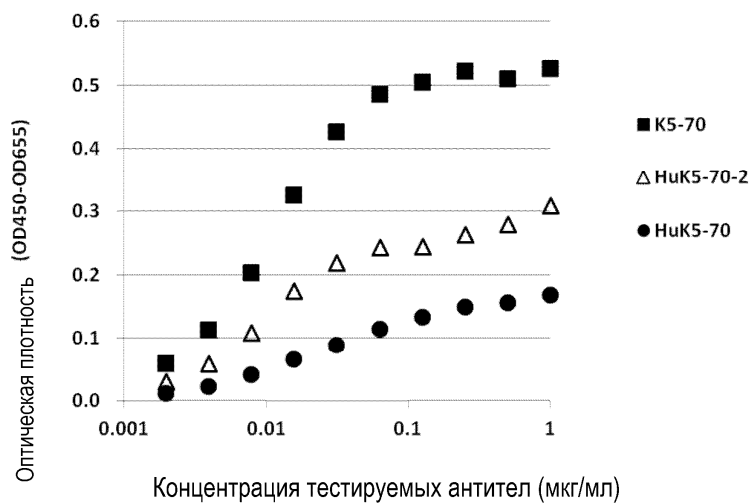
AGG ACA AGC ATG GCC GAT TAC TGG GGA CAA GGG ACC CTG GTG ACC GTG AGC AGC GCT AGC
R  T  S  M  A  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
    
```

Фиг. 69



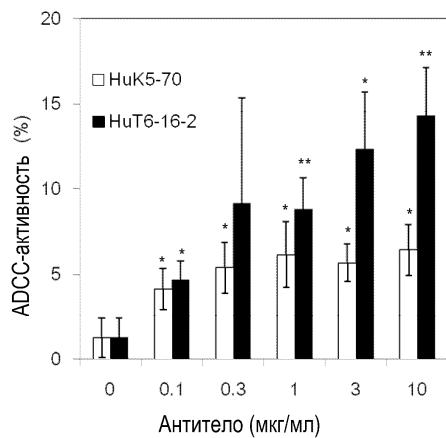
Фиг. 70

035947



Фиг. 71

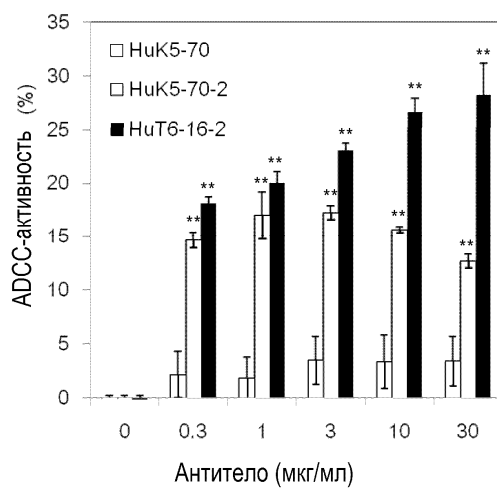
SW480



*P < 0.05, **P < 0.01

Фиг. 72А

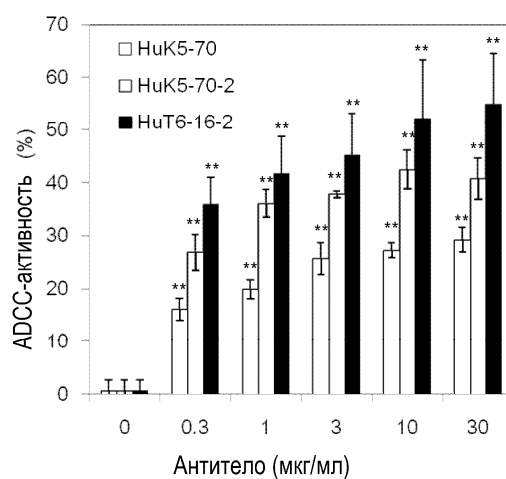
PK-59



**P < 0.01

Фиг. 72В

PC-3



**P < 0.01

Фиг. 72С

