

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

Brevetto europeo No. 3088419

Domanda di brevetto europeo No. 14874745.4

Data di deposito: 24 dicembre 2014

Classificazione Internazionale: C07K16/28, A61K31/4745, A61K39/395, A61K47/68, A61P35/00, C12N15/09,

5 C07K16/30

Priorità: Giapponese No. 20130267548 del 25 dicembre 2013

Titolo: "CONIUGATO ANTICORPO ANTI-TROP2-FARMACO"

Richiedenti: Daiichi Sankyo Company, Limited
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku

10 Tokyo 103-8426

Giappone

Sapporo Medical University

291-85, Minami 1-jo

Nishi 17-chome

15 Chuo-ku

Sapporo-shi, Hokkaido 060-8556

Giappone

Inventori: AGATSUMA, Toshinori

TAKAHASHI, Shu

20 HASEGAWA, Jun

OKAJIMA, Daisuke

HAMADA, Hirofumi

YAMAGUCHI, Miki

Descrizione

Campo tecnico

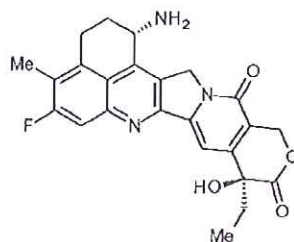
La presente invenzione riguarda un coniugato anticorpo-farmaco avente un farmaco antitumorale coniugato ad un anticorpo anti-TROP2 attraverso un gruppo funzionale strutturale di collegamento, essendo il coniugato utile come
5 farmaco antitumorale.

Sfondo dell'arte

Un coniugato anticorpo-farmaco (ADC) avente un farmaco con citotossicità coniugato ad un anticorpo, il cui antigene viene espresso su una superficie delle cellule cancerose ed il quale si lega anche ad un antigene capace di
10 internalizzazione cellulare, e quindi può rilasciare selettivamente il farmaco alle cellule cancerose ed è così atteso che causi l'accumulo del farmaco all'interno delle cellule cancerose ed uccida le cellule cancerose (si veda, letteratura non brevettuale da 1 a 3). Come ADC, Mylotarg (Gemtuzumab ozogamicina (marchio registrato)) in cui la calicheamicina è coniugata ad un anticorpo anti-CD33 è approvato come agente terapeutico per la leucemia mieloide acuta. Inoltre, Adcetris (Brentuximab vedotin (marchio registrato)), in cui l'auristatina E è coniugata ad un anticorpo anti-CD30, è stato
15 recentemente approvato come agente terapeutico per il linfoma di Hodgkin e per il linfoma anaplastico a grandi cellule (si veda, letteratura non brevettuale 4). I farmaci contenuti in ADC che sono stati approvati finora sono diretti verso il DNA o la tubulina.

Riguardo ad un antitumorale, sono noti composti a basso peso molecolare, derivati della camptotecina, composti che inibiscono la topoisomerasi I per mostrare un effetto antitumorale. Tra essi, un composto antitumorale rappresentato dalla formula sotto

[Formula 1]



(exatecano, nome chimico: (1S,9S)-1-ammino-9-etil-5-fluoro-2,3-diidro-9-idrossi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-10,13 (9H,15H)-dione) è un derivato idrosolubile della camptotecina (letteratura brevettuale 1 e 2). Diversamente dall'irinotecano attualmente utilizzato in studi clinici, questo composto non richiede un'attivazione mediante un enzima per esercitare un effetto antitumorale. Inoltre, l'attività inibitoria sulla topoisomerasi I è superiore rispetto ad SN-38 che è un principale principio farmaceuticamente attivo dell'irinotecano e del topotecano anch'esso utilizzato in studi clinici, ed una superiore attività citocida in vitro viene ottenuta nei confronti di varie cellule cancerose. In particolare, esso mostra l'effetto nei confronti di cellule cancerose che hanno una resistenza ad SN-38 o simili a causa dell'espressione della glicoproteina P. Inoltre, in un modello murino di tumore umano trapiantato per via sottocutanea, esso ha mostrato un potente effetto antitumorale, e così è passato agli studi clinici, ma non è ancora stato messo sul mercato (si veda, letteratura non brevettuale da 5 a 10). Rimane non chiaro se l'exatecano agisca efficacemente come ADC oppure no.

DE-310 è un complesso in cui l'exatecano è coniugato ad un polimero polialcolico biodegradabile di carbossimetildestrano attraverso uno spaziatore peptidico GGFG (letteratura brevettuale 3 e letteratura non brevettuale 30 e 31). Gli spaziatori peptidici comprendenti il tetrapeptide GGFG vengono discussi nella letteratura non brevettuale 32. Convertendo l'exatecano in forma di un profarmaco polimerico, può essere mantenuta una proprietà di elevata ritenzione sanguigna e vengono passivamente aumentate anche una proprietà di elevato indirizzamento ad un'area tumorale utilizzando la permeabilità aumentata di vasi sanguigni appena formati all'interno di un tumore ed una proprietà di ritenzione in tessuti tumorali. Con DE-310, attraverso una scissione dello spaziatore peptidico mediante un enzima,

l'exatecano e l'exatecano con glicina connessi ad un gruppo ammino sono continuamente rilasciati come principale principio attivo. Di conseguenza, la farmacocinetica è migliorata. DE-310 è risultato avere un'efficacia superiore rispetto all'exatecano somministrato da solo anche se la quantità totale di exatecano ivi contenuta è inferiore rispetto al caso di somministrazione dell'exatecano da solo secondo vari modelli di valutazione dei tumori in studi non clinici. È stato
5 condotto uno studio clinico per DE-310, e sono anche stati confermati casi efficaci, in cui era presente un rapporto che suggerisce che il principio attivo principale si accumula in un tumore piuttosto che in tessuti normali, tuttavia, vi è anche un rapporto che indica che l'accumulo di DE-310 e del principio attivo principale in un tumore non è molto differente dall'accumulo in tessuti normali nell'uomo, e così non viene osservato alcun indirizzamento passivo nell'uomo (si veda, letteratura non brevettuale da 11 a 14). Di conseguenza, anche DE-310 non è stato commercializzato, e rimane non chiaro
10 se l'exatecano agisca efficacemente come farmaco diretto a tale indirizzamento oppure no.

Come composto relativo a DE-310, è anche noto un complesso in cui un gruppo funzionale strutturale rappresentato da $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$ è inserito tra lo spaziatore -GGFG- e l'exatecano per formare $\text{-GGFG-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$ utilizzato come struttura spaziatrice (letteratura brevettuale 4). Tuttavia, l'effetto antitumorale del suddetto complesso non è affatto noto.

15 TROP2 umana (TACSTD2: trasduttore 2 associato a tumore del segnale del calcio, GA733-1, EGP-1, M1S1; in seguito, indicato come hTROP2) è una proteina transmembrana a singolo passo di tipo 1 della membrana cellulare costituita da 323 residui amminoacidici. Anche se è stata precedentemente suggerita la presenza di una proteina della membrana cellulare coinvolta nella resistenza immunitaria, la quale è comune per i trofoblasti e le cellule cancerose umani (letteratura non brevettuale 15), una molecola antigenica riconosciuta da un anticorpo monoclonale (162-25.3 o 162-46.2)
20 contro una proteina della membrana cellulare in una linea cellulare di coriocarcinoma umano è stata identificata ed indicata come TROP2 come una delle molecole espresse nei trofoblasti umani (letteratura non brevettuale 16). Questa molecola è anche stata trovata in seguito da altri ricercatori ed indicata anche come antigene tumorale GA733-1 riconosciuto da un anticorpo monoclonale GA733 di topo (letteratura non brevettuale 17) ottenuto mediante l'immunizzazione con una linea cellulare di cancro dello stomaco o con una glicoproteina epiteliale (EGP-1; letteratura
25 non brevettuale 18) riconosciuta da un anticorpo monoclonale RS7-3G11 di topo ottenuto mediante l'immunizzazione

con cellule di cancro del polmone non a piccole cellule. Nel 1995, tuttavia, il gene di TROP2 è stato clonato, ed è stato confermato che tutte queste molecole sono molecole identiche (letteratura non brevettuale 19). La sequenza di DNA e la sequenza amminoacidica di hTROP2 sono disponibili su una banca dati pubblica e possono essere indicate, per esempio, con i numeri di accesso NM_002353 ed NP_002344 (NCBI).

5 Il gene di hTROP2 costituisce la famiglia di geni di TACSTD, insieme al gene di TROP-1 umano (EpCAM, EGP-2, TACSTD1) avente circa il 50% di omologia (letteratura non brevettuale 21). La proteina hTROP2 è costituita da una sequenza segnale composta da 26 residui amminoacidici aminoterminali, un dominio extracellulare composto da 248 residui amminoacidici, un dominio transmembrana costituito da 23 residui amminoacidici, ed un dominio intracellulare composto da 26 residui amminoacidici. Il dominio extracellulare ha quattro siti di glicosilazione legata ad
10 N ed è noto per avere un peso molecolare apparente di circa 10 kD in più del valore teorico calcolato 35 kD (letteratura non brevettuale 19).

Un ligando fisiologico di hTROP2 non è stato identificato, né le sue funzioni molecolari sono state rivelate finora. È stato trovato che hTROP2 trasduce i segnali del calcio nelle cellule tumorali (letteratura non brevettuale 20). Inoltre, hTROP2 è fosforilata ad un residuo intracellulare di serina 303 dalla protein chinasi C, la quale è una chinasi
15 dipendente dal Ca^{2+} (letteratura non brevettuale 18), ed ha una sequenza di legame a PIP2 nel dominio intracellulare, suggerendo funzioni di trasduzione del segnale nelle cellule tumorali (letteratura non brevettuale 22).

Nell'analisi immunohistochimica utilizzando campioni clinici, è stato trovato che hTROP2 è sovraespressa in vari carcinomi delle cellule epiteliali ed è espressa nelle cellule epiteliali in tipi limitati di tessuti normali ad un basso livello di espressione in confronto ai tessuti tumorali (letteratura non brevettuale da 23 a 27). Inoltre, è stato riportato che
20 l'espressione di hTROP2 è in correlazione con la prognosi sfavorevole del cancro del colon-retto (letteratura non brevettuale 23), del cancro dello stomaco (letteratura non brevettuale 24), del cancro del pancreas (letteratura non brevettuale 25), del cancro della bocca (letteratura non brevettuale 26), e del glioma (letteratura non brevettuale 27).

Da modelli che utilizzano cellule di cancro del colon-retto, è stato ulteriormente riportato che l'espressione di hTROP2 è coinvolta nella crescita cellulare delle cellule tumorali indipendente da impalcature e nella tumorigenesi in
25 topi immunodeficienti (letteratura non brevettuale 28).



La letteratura non brevettuale 29 e la letteratura brevettuale 10 descrivono coniugati anticorpo-farmaco contenenti un anticorpo anti-TROP2 (hRS7) coniugato ad un farmaco (SN-38). La letteratura brevettuale 13 descrive coniugati di anticorpi per EPG-1 (anti-TROP2), compreso l'anticorpo hRS7, con agenti antitumorali, compresa la camptotecina, per uso contro il cancro. La letteratura brevettuale 14 descrive ulteriori coniugati di hRS7 ed SN-38. La
5 letteratura non brevettuale 6 descrive la preparazione della camptotecina exatecano (DX-8951) e la sua utilità come agente antitumorale ed indica che è più potente rispetto ad SN-38.

In risposta a tali informazioni che suggeriscono l'associazione con il cancro, una pluralità di anticorpi anti-hTROP2 è stata finora stabilita e studiata per i suoi effetti antitumorali. Tra questi anticorpi, viene qui descritto, per
10 esempio, un anticorpo non coniugato che mostra in se stesso attività antitumorale in modelli murini nudi di xenotrapianto (letteratura brevettuale da 5 ad 8) così come un anticorpo che mostra attività antitumorale come ADC con un farmaco citotossico (letteratura brevettuale da 9 a 12). Tuttavia, la forza o copertura della loro attività è ancora insufficiente, e vi sono necessità mediche insoddisfatte per hTROP2 come bersaglio terapeutico.

Elenco delle citazioni

Letteratura brevettuale

- 15 Letteratura brevettuale 1: brevetto giapponese aperto al pubblico No. 5-59061
Letteratura brevettuale 2: brevetto giapponese aperto al pubblico No. 8-337584
Letteratura brevettuale 3: pubblicazione internazionale WO 1997/46260
Letteratura brevettuale 4: pubblicazione internazionale WO 2000/25825
Letteratura brevettuale 5: pubblicazione internazionale WO 2008/144891
20 Letteratura brevettuale 6: pubblicazione internazionale WO 2011/145744
Letteratura brevettuale 7: pubblicazione internazionale WO 2011/155579
Letteratura brevettuale 8: pubblicazione internazionale WO 2013/077458
Letteratura brevettuale 9: pubblicazione internazionale WO 2003/074566
Letteratura brevettuale 10: pubblicazione internazionale WO 2011/068845
25 Letteratura brevettuale 11: pubblicazione internazionale WO 2013/068946

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

- Letteratura brevettuale 12: brevetto US No. 7999083
Letteratura brevettuale 13: US 2008/131363 A1
Letteratura brevettuale 14: US 2011/293513 A1
Letteratura non brevettuale
- 5 Letteratura non brevettuale 1: Ducry, L., et al., *Bioconjugate Chem.* (2010) 21, da 5 a 13.
Letteratura non brevettuale 2: Alley, S. C, et al., *Current Opinion in Chemical Biology* (2010) 14, da 529 a 537.
Letteratura non brevettuale 3: Damle N.K., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2004) 4, da 1445 a 1452.
Letteratura non brevettuale 4: Senter P. D., et al., *Nature Biotechnology* (2012) 30, da 631 a 637.
Letteratura non brevettuale 5: Kumazawa, E., Tohgo, A., *Exp. Opin. Invest. Drugs* (1998) 7, da 625 a 632.
- 10 Letteratura non brevettuale 6: Mitsui, I., et al., *Jpn J. Cancer Res.* (1995) 86, da 776 a 782.
Letteratura non brevettuale 7: Takiguchi, S., et al., *Jpn J. Cancer Res.* (1997) 88, da 760 a 769.
Letteratura non brevettuale 8: Joto, N. et al., *Int J Cancer* (1997) 72, da 680 a 686.
Letteratura non brevettuale 9: Kumazawa, E. et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1998) 42, da 210 a 220.
Letteratura non brevettuale 10: De Jager, R., et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2000) 922, da 260 a 273.
- 15 Letteratura non brevettuale 11: Inoue, K. et al., *Polymer Drugs in the Clinical Stage*, a cura di Maeda et al. (2003), da 145 a 153.
Letteratura non brevettuale 12: Kumazawa, E. et al., *Cancer Sci* (2004) 95, da 168 a 175.
Letteratura non brevettuale 13: Soepenbergh, O. et al., *Clinical Cancer Research*, (2005) 11, da 703 a 711.
Letteratura non brevettuale 14: Wentz M. N. et al., *Investigational New Drugs* (2005) 23, da 339 a 347.
- 20 Letteratura non brevettuale 15: Faulk WP, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75(4), da 1947 a 1951 (1978).
Letteratura non brevettuale 16: Lipinski M, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(8), da 5147 a 5150 (1981).
Letteratura non brevettuale 17: Linnenbach A J, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86(1), da 27 a 31 (1989).
Letteratura non brevettuale 18: Basu A, et al., *Int. J. Cancer*, 62(4), da 472 a 479 (1995).
Letteratura non brevettuale 19: Fornaro M, et al., *Int. J. Cancer*, 62(5), da 610 a 618 (1995).
- 25 Letteratura non brevettuale 20: Ripani E, et al., *Int. J. Cancer*, 76(5), da 671 a 676 (1998).



Letteratura non brevettuale 21: Calabrese G, et al., Cytogenet. Cell Genet., 92 (da 1 a 2), da 164 a 165 (2001).

Letteratura non brevettuale 22: El Sewedy T, et al., Int. J. Cancer, 75(2), da 324 a 330 (1998).

Letteratura non brevettuale 23: Ohmachi T, et al., Clin. Cancer Res., 12(10), da 3057 a 3063 (2006).

Letteratura non brevettuale 24: Muhlmann G, et al., J. Clin. Pathol., 62(2), da 152 a 158 (2009).

5 Letteratura non brevettuale 25: Fong D, et al., Br. J. Cancer, 99(8), da 1290 a 1295 (2008).

Letteratura non brevettuale 26: Fong D, et al., Mod. Pathol., 21(2), da 186 a 191 (2008).

Letteratura non brevettuale 27: Ning S, et al., Neurol. Sci., 34(10), da 1745 a 1750 (2013).

Letteratura non brevettuale 28: Wang J, et al., Mol. Cancer Ther., 7(2), da 280 a 285 (2008).

Letteratura non brevettuale 29: Cardillo T M, et al., Clin. Cancer Res., 17(10); da 3157 a 3169 (2011).

10 Letteratura non brevettuale 30: Ochi Y, et al., Cancer Chemother. Pharmacol., 55(4): da 323 a 332 (2005).

Letteratura non brevettuale 31: Wentz M N, et al., Investigational New Drugs, 23(4), da 339 a 347 (2005).

Letteratura non brevettuale 32: Shiose Y, et al., Bioconjugate Chem., 20(1), da 60 a 70 (2009).

Riassunto dell'invenzione

Problema tecnico

15 In relazione al trattamento di un tumore mediante un anticorpo, un effetto antitumorale insufficiente può essere osservato anche quando l'anticorpo riconosce un antigene per legarsi alle cellule tumorali, e vi è un caso in cui è richiesto un anticorpo antitumorale più efficace. Inoltre, molti composti antitumorali a basso peso molecolare hanno un problema di sicurezza come effetti collaterali e tossicità, anche se i composti hanno un effetto antitumorale eccellente, rimane come
20 obiettivo raggiungere un effetto terapeutico superiore aumentando ulteriormente la sicurezza. Così, un oggetto della presente invenzione è ottenere un farmaco antitumorale avente un eccellente effetto terapeutico, il quale è eccellente in termini di effetto antitumorale e di sicurezza.

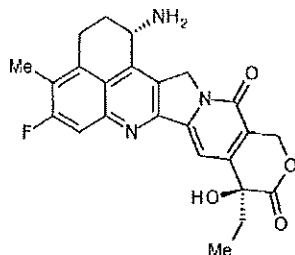
25 Gli inventori hanno pensato che, quando un composto antitumorale exatecano viene convertito in un coniugato anticorpo-farmaco, attraverso un gruppo funzionale strutturale di collegamento, mediante coniugazione all'anticorpo anti-TROP2, il quale è in grado di bersagliare le cellule tumorali, il quale ha una proprietà in grado di riconoscere le cellule tumorali, una proprietà in grado di legarsi alle cellule tumorali, una proprietà di essere internalizzato all'interno delle

5 cellule tumorali, o simili, può essere ottenuta l'attività citocida sulla base dell'anticorpo, il composto antitumorale può essere rilasciato più sicuramente alle cellule tumorali per mostrare specificamente l'effetto antitumorale del composto in cellule tumorali, e così l'effetto antitumorale può essere sicuramente mostrato, ed una dose del composto antitumorale può essere ridotta rispetto ad un caso di somministrazione del composto da solo, e così può essere alleviata un'influenza del composto antitumorale sulle cellule normali così che possa essere ottenuta una sicurezza maggiore.

A questo proposito, gli inventori hanno generato un gruppo di collegamento con una struttura specifica e sono riusciti ad ottenere un coniugato anticorpo-farmaco in cui l'anticorpo anti-TROP2 e l'exatecano sono coniugati l'uno all'altro attraverso il gruppo di collegamento, ed hanno confermato un effetto antitumorale eccellente mostrato dal coniugato per completare quindi la presente invenzione.

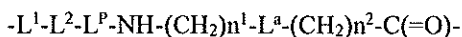
10 Specificamente, la presente invenzione riguarda i seguenti.

[1] Un coniugato anticorpo-farmaco in cui un composto antitumorale rappresentato dalla seguente formula:



viene coniugato ad un anticorpo anti-TROP2 mediante un legame tioetere che si forma ad un gruppo funzionale per un legame disolfuro presente in una parte cerniera dell'anticorpo anti-TROP2 attraverso un gruppo di collegamento avente una struttura rappresentata dalla seguente formula:

15



in cui l'anticorpo anti-TROP2 è connesso al terminale di L^1 , il composto antitumorale è connesso al gruppo carbonile del gruppo funzionale $-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ con l'atomo di azoto del gruppo ammino in posizione 1 come posizione di connessione,

20 in cui

n^1 rappresenta un numero intero da 0 a 6,

n^2 rappresenta un numero intero da 0 a 5,

L^1 rappresenta $-(\text{succinimid-3-il-N})-(\text{CH}_2)_{n^3}-\text{C}(=\text{O})-$,

in cui n^3 rappresenta un numero intero da 2 ad 8,

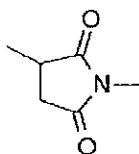
5 L^2 rappresenta $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ od un legame singolo,

in cui n^4 rappresenta un numero intero da 1 a 6,

L^p rappresenta un residuo tetrapeptidico di $-\text{GGFG}-$,

L^a rappresenta $-\text{O}-$ od un legame singolo, e

$-(\text{succinimid-3-il-N})-$ ha una struttura rappresentata dalla seguente formula:



10

che è connessa all'anticorpo anti-TROP2 nella sua posizione 3 ed è connessa ad un gruppo metilene nella struttura di collegamento contenente questa struttura sull'atomo di azoto in posizione 1,

in cui l'anticorpo anti-TROP2 comprende CDRH1 composta dalla sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 23,

CDRH2 composta dalla sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 24 e CDRH3 composta dalla sequenza

15

amminoacidica della SEQ ID NO: 25 nella sua regione variabile della catena pesante e CDRL1 composta dalla sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 26, CDRL2 composta dalla sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 27 e CDRL3 composta dalla sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 28 nella sua regione variabile della catena leggera.

[2] Il coniugato anticorpo-farmaco secondo il punto [1], in cui il gruppo funzionale strutturale di collegamento del farmaco avente un farmaco connesso ad $-\text{L}^1-\text{L}^2-\text{L}^p-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ è una struttura di collegamento del farmaco

20

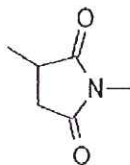
scelta dal seguente gruppo:

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

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

- (succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
(succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
(succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
(succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
5 (succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
(succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
(succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
10 (succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX), e
(succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX);

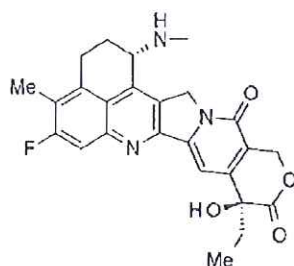
in cui -(succinimid-3-il-N)- ha una struttura rappresentata dalla seguente formula:



15

che è connessa all'anticorpo anti-TROP2 nella sua posizione 3 ed è connessa ad un gruppo metilene nella struttura di collegamento contenente questa struttura sull'atomo di azoto in posizione 1,

(NH-DX) rappresenta un gruppo rappresentato dalla seguente formula:



in cui l'atomo di azoto del gruppo ammino in posizione 1 è una posizione di connessione, e GGFG- rappresenta un residuo tetrapeptidico di -Gly-Gly-Phe-Gly-.

5 [3] Il coniugato anticorpo-farmaco secondo il punto [2], in cui il gruppo funzionale strutturale di collegamento del farmaco è una struttura di collegamento del farmaco scelta dal seguente gruppo:

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

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

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

10 [4] Il coniugato anticorpo-farmaco secondo il punto [3], in cui il gruppo funzionale strutturale di collegamento del farmaco è:

(succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

[5] Il coniugato anticorpo-farmaco secondo il punto [3], in cui il gruppo funzionale strutturale di collegamento del farmaco è:

15 (succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

[6] Il coniugato anticorpo-farmaco secondo il punto [3], in cui il gruppo funzionale strutturale di collegamento del farmaco è:

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

20 [7] Il coniugato anticorpo-farmaco secondo uno qualsiasi dei punti da [1] a [6], in cui l'anticorpo anti-TROP2 comprende

- una catena pesante ed una catena leggera scelte nel gruppo;
una regione variabile della catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 140 della SEQ ID NO: 12 ed una regione variabile della catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 129 della SEQ ID NO: 18,
- 5 una regione variabile della catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 140 della SEQ ID NO: 14 ed una regione variabile della catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 129 della SEQ ID NO: 18,
una regione variabile della catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 140 della SEQ ID NO: 14 ed una regione variabile della catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 129 della SEQ ID NO: 20, ed
- 10 una regione variabile della catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 140 della SEQ ID NO: 16 ed una regione variabile della catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 129 della SEQ ID NO: 22.
- [8] Il coniugato anticorpo-farmaco secondo uno qualsiasi dei punti da [1] a [6], in cui l'anticorpo anti-TROP2 comprende
- 15 una catena pesante ed una catena leggera scelte nel gruppo;
una catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 470 della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 234 della SEQ ID NO: 18,
una catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 470 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 234 della SEQ ID NO: 18,
- 20 una catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 470 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 234 della SEQ ID NO: 20, ed
una catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 470 della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 234 della SEQ ID NO: 22.
- [9] Il coniugato anticorpo-farmaco secondo uno qualsiasi dei punti da [1] a [6], in cui l'anticorpo anti-TROP2 comprende
- 25 una regione variabile della catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 140 della SEQ

ID NO: 12 ed una regione variabile della catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 129 della SEQ ID NO: 18.

5 [10] Il coniugato anticorpo-farmaco secondo uno qualsiasi dei punti da [1] a [6], in cui l'anticorpo anti-TROP2 comprende una catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 470 della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 234 della SEQ ID NO: 18.

[11] Il coniugato anticorpo-farmaco secondo il punto [8], in cui l'anticorpo anti-TROP2 manca di un residuo di lisina all'estremità carbossiterminale della catena pesante.

[12] Il coniugato anticorpo-farmaco secondo il punto [10], in cui l'anticorpo anti-TROP2 manca di un residuo di lisina all'estremità carbossiterminale della catena pesante.

10 [13] Il coniugato anticorpo-farmaco secondo uno qualsiasi dei punti da [1] a [12], in cui un numero medio di unità della struttura di collegamento del farmaco scelta coniugate per anticorpo è in un intervallo da 2 ad 8.

[14] Il coniugato anticorpo-farmaco secondo uno qualsiasi dei punti da [1] a [12], in cui un numero medio di unità della struttura di collegamento del farmaco scelta coniugate per anticorpo è in un intervallo da 3 ad 8.

15 [15] Un farmaco contenente il coniugato anticorpo-farmaco secondo uno qualsiasi dei punti da [1] a [14], un suo sale, od un suo idrato.

[16] Un farmaco antitumorale e/o un farmaco anticancro contenenti il coniugato anticorpo-farmaco secondo uno qualsiasi dei punti da [1] a [14], un loro sale, od un loro idrato.

20 [17] Il farmaco antitumorale e/o il farmaco anticancro secondo il punto [16], per l'uso in un metodo di trattamento del cancro del polmone, del cancro del rene, del cancro dell'urotelio, del cancro del colon-retto, del cancro della prostata, del glioblastoma multiforme, del cancro dell'ovaio, del cancro del pancreas, del cancro della mammella, del melanoma, del cancro del fegato, del cancro della vescica, del cancro dello stomaco, del carcinoma del collo dell'utero, del cancro della testa e del collo, o del cancro dell'esofago.

25 [18] Una composizione farmaceutica comprendente il coniugato anticorpo-farmaco secondo uno qualsiasi dei punti da [1] a [14], un suo sale, od un suo idrato come principio attivo, ed un componente della formulazione farmaceuticamente accettabile.

[19] La composizione farmaceutica secondo il punto [18], per l'uso in un metodo di trattamento del cancro del polmone, del cancro del rene, del cancro dell'urotelio, del cancro del colon-retto, del cancro della prostata, del glioblastoma multiforme, del cancro dell'ovaio, del cancro del pancreas, del cancro della mammella, del melanoma, del cancro del fegato, del cancro della vescica, del cancro dello stomaco, del carcinoma del collo dell'utero, del cancro della testa e del collo, o del cancro dell'esofago.

Effetti vantaggiosi dell'invenzione

Con un coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco avente un composto antitumorale exatecano coniugato attraverso un gruppo di collegamento con una struttura specifica, possono essere ottenuti un effetto antitumorale ed una sicurezza eccellenti.

10 Breve descrizione dei disegni

[Figura 1] La figura 1 mostra una sequenza nucleotidica (SEQ ID NO: 7) ed una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO: 8) di una catena pesante dell'anticorpo cTINA1.

[Figura 2] La figura 2 mostra una sequenza nucleotidica (SEQ ID NO: 9) ed una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO: 10) di una catena leggera dell'anticorpo cTINA1.

15 [Figura 3] La figura 3 mostra una sequenza nucleotidica (SEQ ID NO: 11) ed una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO: 12) di una catena pesante hTINA1-H1.

[Figura 4] La figura 4 mostra una sequenza nucleotidica (SEQ ID NO: 13) ed una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO: 14) di una catena pesante hTINA1-H2.

20 [Figura 5] La figura 5 mostra una sequenza nucleotidica (SEQ ID NO: 15) ed una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO: 16) di una catena pesante hTINA1-H3.

[Figura 6] La figura 6 mostra una sequenza nucleotidica (SEQ ID NO: 17) ed una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO: 18) di una catena leggera hTINA1-L1.

[Figura 7] La figura 7 mostra una sequenza nucleotidica (SEQ ID NO: 19) ed una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO: 20) di una catena leggera hTINA1-L2.

25 [Figura 8] La figura 8 mostra una sequenza nucleotidica (SEQ ID NO: 21) ed una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO:

22) di una catena leggera hTINA1-L3.

[Figura 9] La figura 9 mostra una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO: 23) di CDRH1 di un anticorpo TINA1, una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO: 24) di CDRH2 di questo, una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO: 25) di CDRH3 di questo, una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO: 26) di CDRL1 di questo, una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO: 27) di CDRL2 di questo, ed una sequenza amminoacidica (SEQ ID NO: 28) di CDRL3 di questo.

[Figura 10] La figura 10 mostra la capacità di internalizzazione cellulare di un anticorpo anti-CD9, di un anticorpo anti-CD46, di un anticorpo anti-CD55, di un anticorpo anti-CD59, di un anticorpo anti-CD71, di un anticorpo anti-CD73, di un anticorpo anti-CD147, di un anticorpo anti-CD276, di un anticorpo anti-EpCAM, di un anticorpo anti-EGFR, e di un anticorpo anti-TROP2 (anticorpo TINA1).

[Figura 11] La figura 11 mostra la capacità di internalizzazione cellulare di un anticorpo anti-CD59, di un anticorpo anti-CD71, di un anticorpo anti-EGFR, di un anticorpo anti-EpCAM, e di un anticorpo anti-TROP2 (anticorpo TINA1).

[Figura 12] La figura 12 mostra la capacità di internalizzazione cellulare di vari anticorpi anti-TROP2.

[Figura 13] La figura 13 mostra l'effetto antitumorale di un coniugato anticorpo-farmaco (1), (6), o (12) su una linea cellulare umana di cancro del colon-retto COLO205 trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 14] La figura 14 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (1), (6), o (12) su una linea cellulare umana di adenocarcinoma pancreatico BxPC-3 trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 15] La figura 15 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (1), (6), o (12) su una linea cellulare umana di adenocarcinoma pancreatico Capan-1 trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 16] La figura 16 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (2), (5), (7), o (10) su una linea cellulare umana di cancro del colon-retto COLO205 trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 17] La figura 17 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (2), (5), (7), o (10) su una linea cellulare umana di adenocarcinoma pancreatico BxPC-3 trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 18] La figura 18 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) su una linea cellulare umana di cancro del colon-retto COLO205 trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 19] La figura 19 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) su una linea

cellulare umana di adenocarcinoma pancreatico BxPC-3 trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 20] La figura 20 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) su una linea cellulare umana di cancro dell'ovaio NIH:OVCA3 trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 21] La figura 21 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) su una linea cellulare umana di cancro dello stomaco NCI-N87 trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 22] La figura 22 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) su una linea cellulare umana di cancro del polmone NCI-H292 trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 23] La figura 23 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) su una linea cellulare umana di cancro della gola FaDu trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 24] La figura 24 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) su una linea cellulare umana di adenocarcinoma pancreatico CFPAC-1 trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 25] La figura 25 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (8) o (13) su una linea cellulare umana di adenocarcinoma pancreatico CFPAC-1 trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 26] La figura 26 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (8) o (13) su una linea cellulare umana di adenocarcinoma pancreatico HPAC trapiantata per via sottocutanea in topi BALB/c-nu/nu.

[Figura 27] La figura 27 mostra l'effetto antitumorale del coniugato anticorpo-farmaco (8) o (13) su tessuti umani di cancro dell'esofago trapiantati per via sottocutanea su topi NOD-SCID.

Descrizione delle forme di realizzazione

In seguito, modi preferiti per realizzare la presente invenzione verranno descritti con riferimento ai disegni. Le forme di realizzazione descritte sotto vengono fornite come esempi tipici delle forme di realizzazione della presente invenzione e non sono intese a limitare l'ambito della presente invenzione.

Il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione è un farmaco antitumorale in cui un anticorpo anti-TROP2 viene coniugato ad un composto antitumorale attraverso un gruppo funzionale strutturale di collegamento e spiegato in dettaglio qui sotto.

[Anticorpo]

L'anticorpo anti-TROP2 utilizzato nel coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione può essere derivato da qualsiasi specie, ed esempi preferiti della specie possono includere uomo, ratti, topi, e conigli. Nel caso in cui sia derivato da specie diverse dall'uomo, è preferibilmente chimerizzato od umanizzato utilizzando una tecnica ben nota. L'anticorpo della presente invenzione può essere un anticorpo policlonale od un anticorpo monoclonale ed è preferibilmente un anticorpo monoclonale.

L'anticorpo anti-TROP2 è in grado di bersagliare le cellule tumorali, cioè, ha una proprietà in grado di riconoscere una cellula tumorale, una proprietà in grado di legarsi ad una cellula tumorale, una proprietà di essere internalizzato in una cellula tumorale, o simili, e può essere convertito in un coniugato anticorpo-farmaco mediante coniugazione ad un composto avente attività antitumorale attraverso un gruppo di collegamento.

L'attività di legame dell'anticorpo nei confronti delle cellule tumorali può essere confermata utilizzando la citometria a flusso. Esempi del metodo per confermare l'internalizzazione dell'anticorpo nelle cellule tumorali possono includere (1) un saggio di visualizzazione di un anticorpo incorporato nelle cellule al microscopio a fluorescenza utilizzando un anticorpo secondario (marcato in modo fluorescente) che si lega all'anticorpo terapeutico (Cell Death and Differentiation (2008) 15, da 751 a 761), (2) un saggio di misurazione di un'intensità di fluorescenza incorporata nelle cellule utilizzando un anticorpo secondario (marcato in modo fluorescente) che si lega all'anticorpo terapeutico (Molecular Biology of the Cell, volume 15, da 5268 a 5282, dicembre 2004), o (3) un saggio Mab-ZAP che utilizza un'immunosina che si lega all'anticorpo terapeutico in cui la tossina viene rilasciata a seguito dell'incorporazione nelle cellule per inibire la crescita cellulare (Bio Techniques 28: da 162 a 165, gennaio 2000). Una proteina ricombinante complessa di una regione catalitica della tossina difterica e di una proteina G può essere utilizzata come immunotossina.

Poiché il farmaco coniugato nel coniugato anticorpo-farmaco esercita un effetto antitumorale, è preferito ma non essenziale che l'anticorpo stesso abbia un effetto antitumorale. Allo scopo di esercitare specificamente e selettivamente l'attività citocida del composto antitumorale sulle cellule tumorali, è importante ed anche preferito che l'anticorpo abbia la proprietà di essere internalizzato per migrare nelle cellule tumorali.

L'anticorpo anti-TROP2 può essere ottenuto utilizzando un metodo solitamente realizzato nell'arte, il quale

implica l'immunizzazione degli animali con un polipeptide antigenico e la raccolta e la purificazione degli anticorpi prodotti in vivo. L'origine dell'antigene non è limitata all'uomo, e gli animali possono essere immunizzati con un antigene derivato da un animale diverso dall'uomo quale un topo, un ratto e simili. In questo caso, la reattività incrociata degli anticorpi che si legano all'antigene eterologo ottenuto con antigeni umani può essere testata per esaminare un anticorpo applicabile ad una malattia umana.

In alternativa, cellule producenti anticorpi che producono anticorpi contro l'antigene sono fuse con cellule di mieloma secondo un metodo noto nell'arte (per esempio Kohler e Milstein, *Nature* (1975) 256, pagine da 495 a 497; ed a cura di Kennet, R., *Monoclonal Antibodies*, pagine da 365 a 367, Plenum Press, N.Y. (1980)) per stabilire ibridomi, da cui possono a loro volta essere ottenuti anticorpi monoclonali.

L'antigene può essere ottenuto ingegnerizzando geneticamente le cellule ospiti per produrre un gene codificante per la proteina antigenica. Specificamente, vettori che permettono l'espressione del gene dell'antigene vengono preparati e trasferiti alle cellule ospiti così che il gene venga espresso. L'antigene così espresso può essere purificato. L'anticorpo può anche essere ottenuto utilizzando un metodo di immunizzazione degli animali con le cellule esprimenti un antigene ingegnerizzate geneticamente descritte sopra o con una linea cellulare esprimente l'antigene.

L'anticorpo anti-TROP2 può essere ottenuto mediante una procedura nota nell'arte.

L'anticorpo anti-TROP2 che può essere utilizzato nella presente invenzione non è particolarmente limitato e, per esempio, possono essere preferibilmente utilizzati quelli specificati dalle sequenze amminoacidiche mostrate nell'elenco delle sequenze della presente domanda. L'anticorpo anti-TROP2 utilizzato nella presente invenzione ha preferibilmente proprietà come descritte sotto.

(1) Un anticorpo avente le seguenti proprietà:

(a) si lega specificamente a TROP2, e

(b) ha un'attività di internalizzazione in cellule esprimenti TROP2 legandosi a TROP2.

(2) L'anticorpo secondo il punto (1), in cui TROP2 è TROP2 umana.

(3) L'anticorpo secondo il punto (1) o (2), in cui l'anticorpo ha CDRH1 comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 23, CDRH2 comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO:

- 24, e CDRH3 comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 25 come regioni determinanti la complementarità della catena pesante, e CDRL1 comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 26, CDRL2 comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 27, e CDRL3 comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 28 come regioni determinanti la complementarità della catena leggera.
- 5 (4) L'anticorpo secondo qualsiasi dei punti da (1) a (3), in cui la sua regione costante è una regione costante di derivazione umana.
- (5) L'anticorpo secondo qualsiasi dei punti da (1) a (4), in cui l'anticorpo è un anticorpo umanizzato.
- 10 (6) L'anticorpo secondo il punto (5), in cui l'anticorpo ha una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto da (a) una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 12, (b) una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 14, (c) una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 16, (d) una sequenza amminoacidica avente almeno il 95% o più di omologia con qualsiasi delle sequenze da (a) a (c), ed (e) una sequenza amminoacidica derivata da qualsiasi delle sequenze da (a) a (c) mediante le delezioni, le sostituzioni, o le aggiunte di almeno un amminoacido, ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto da (f) una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 18, (g) una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 20, (h) una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 22, (i) una sequenza amminoacidica avente almeno il 95% o più di omologia con qualsiasi delle sequenze da (f) ad (h), e (j) una sequenza amminoacidica derivata da qualsiasi delle sequenze da (f) ad (h) mediante le delezioni, le sostituzioni, o le aggiunte di almeno un amminoacido.
- 15 20 (7) L'anticorpo secondo il punto (6), in cui l'anticorpo ha una regione variabile della catena pesante ed una regione variabile della catena leggera scelte nel gruppo composto da una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 12 ed una regione
- 25

- variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 18, una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 12 ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 20,
- 5 una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 12 ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 22, una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 14 ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica
- 10 descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 18, una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 14 ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 20, una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 14 ed una regione variabile della
- 15 catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 22, una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 16 ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 18, una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da
- 20 20 a 140 nella SEQ ID NO: 16 ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 20, ed una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 16 ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 22.
- 25 (8) L'anticorpo secondo il punto (7), in cui l'anticorpo ha una regione variabile della catena pesante ed una regione

variabile della catena leggera scelte nel gruppo composto da una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 12 ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 18, una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 14 ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 18, una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 14 ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 20, ed una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 nella SEQ ID NO: 16 ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 nella SEQ ID NO: 22.

(9) L'anticorpo secondo il punto (6) o (7), in cui l'anticorpo comprende una catena pesante ed una catena leggera scelte nel gruppo composto da una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 nella SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 nella SEQ ID NO: 18, una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 nella SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 nella SEQ ID NO: 20, una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 nella SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 nella SEQ ID NO: 22, una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 nella SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 nella SEQ ID NO: 18, una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 nella SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 234

nella SEQ ID NO: 20, una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 nella SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 nella SEQ ID NO: 22, una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 nella SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera
5 comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 nella SEQ ID NO: 18, una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 nella SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 nella SEQ ID NO: 20, ed una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 nella SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera comprendente una
10 sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 nella SEQ ID NO: 22.

(10) L'anticorpo secondo il punto (6) o (7), in cui l'anticorpo comprende una catena pesante ed una catena leggera scelte nel gruppo composto da una catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 18, una catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera
15 comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 20, una catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 22, una catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 18, una catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 14 ed
20 una catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 20, una catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 22, una catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 18, una catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla
25 SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 20, ed

una catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 22.

5 (11) L'anticorpo secondo il punto (8), in cui l'anticorpo comprende una catena pesante ed una catena leggera scelte nel gruppo composto da una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 nella SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 nella SEQ ID NO: 18, una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 nella SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 nella SEQ ID NO: 18, una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 nella SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 nella SEQ ID NO: 20, ed una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 nella SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica descritta nelle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 nella SEQ ID NO: 22.

15 (12) L'anticorpo secondo qualsiasi dei punti da (1) ad (11), in cui l'anticorpo manca di un residuo di lisina all'estremità carbossiterminale della catena pesante.

(13) Un anticorpo ottenuto mediante un metodo per produrre l'anticorpo secondo qualsiasi dei punti da (1) a (12), il metodo comprendendo i passaggi di: sottoporre a coltura una cellula ospite trasformata con un vettore di espressione contenente un polinucleotide codificante per l'anticorpo; e raccogliere l'anticorpo d'interesse dalle colture ottenute nel passaggio precedente.

20 In seguito, viene descritto l'anticorpo anti-TROP2 utilizzato nell'invenzione.

I termini "cancro" e "tumore" come qui utilizzati vengono utilizzati con lo stesso significato.

Il termine "gene" come qui utilizzato non comprende solo DNA, ma anche suo mRNA, suo cDNA, e suo cRNA.

Il termine "polinucleotide" come qui utilizzato viene utilizzato con lo stesso significato di acido nucleico e comprende anche DNA, RNA, sonde, oligonucleotidi, ed inneschi.

25 I termini "polipeptide" e "proteina" come qui utilizzati vengono utilizzati senza distinzione.

Il termine "cellula" come qui utilizzato comprende anche cellule in un soggetto animale e cellule sottoposte a coltura.

Il termine "TROP2" come qui utilizzato viene utilizzato con lo stesso significato di proteina TROP2.

5 Il termine "CDR" come qui utilizzato si riferisce ad una regione determinante la complementarietà (CDR). È noto che ciascuna catena pesante e leggera di una molecola anticorpale ha tre regioni determinanti la complementarietà (CDR). La CDR è chiamata anche dominio ipervariabile, ed è presente in una regione variabile di ciascuna catena pesante e leggera di un anticorpo. È un sito che ha una variabilità insolitamente elevata nella sua struttura primaria, e vi sono tre CDR separate nella struttura primaria di ciascuna catena polipeptidica pesante e leggera. In questa descrizione, come per le CDR di un anticorpo, le CDR della catena pesante sono rappresentate da CDRH1, CDRH2, e CDRH3 dal lato amminotermine della sequenza amminoacidica della catena pesante, e le CDR della catena leggera sono rappresentate da CDRL1, CDRL2, e CDRL3 dal lato amminotermine della sequenza amminoacidica della catena leggera. Questi siti sono vicini l'uno all'altro nella struttura terziaria e determinano la specificità per un antigene a cui l'anticorpo si lega.

15 La frase "l'ibridazione viene eseguita in condizioni stringenti" come qui utilizzata si riferisce ad un procedimento in cui l'ibridazione viene eseguita in condizioni in cui l'identificazione può essere ottenuta eseguendo l'ibridazione a 68°C in una soluzione per l'ibridazione disponibile in commercio ExpressHyb Hybridization Solution (prodotta da Clontech, Inc.) od eseguendo l'ibridazione a 68°C in presenza di NaCl da 0,7M ad 1,0M utilizzando un filtro avente DNA immobilizzato su di esso, cui segue l'esecuzione del lavaggio a 68°C utilizzando una soluzione di SSC da 0,1x a 2x (la soluzione di SSC 1x è costituita da NaCl 150mM e da citrato di sodio 15mM) od in condizioni equivalenti a queste.

1. TROP2

20 TROP2 è un membro della famiglia di TACSTD espresso nei trofoblasti umani ed è una proteina transmembrana a singolo passo di tipo 1 della membrana cellulare coinvolta nella resistenza immunitaria, la quale è comune per i trofoblasti e le cellule cancerose umani.

25 Per quanto riguarda la proteina TROP2 da utilizzare nell'invenzione, la proteina TROP2 può essere purificata direttamente dalle cellule esprimenti TROP2 di un uomo o di un mammifero diverso dall'uomo (quale un ratto od un topo) ed utilizzata, od una frazione di membrana cellulare delle cellule descritte sopra può essere preparata ed utilizzata.

Inoltre, TROP2 può essere ottenuta mediante sua sintesi in vitro o sua produzione in una cellula ospite attraverso l'ingegneria genetica. Nell'ingegneria genetica, specificamente, dopo che il cDNA di TROP2 viene integrato in un vettore in grado di esprimere il cDNA di TROP2, la proteina TROP2 può essere ottenuta sintetizzandola in una soluzione contenente un enzima, un substrato ed una sostanza energetica richiesta per la trascrizione e per la traduzione, od esprimendo TROP2 in un'altra cellula ospite procariotica od eucariotica trasformata. In alternativa, le cellule esprimenti TROP2 ingegnerizzate geneticamente descritte sopra od una linea cellulare esprimente TROP2 possono essere utilizzate come proteina TROP2.

La sequenza nucleotidica e la sequenza amminoacidica di TROP2 sono disponibili su una banca dati pubblica e possono essere indicate, per esempio, con i No. di accesso NM_002353 ed NP_002344 (NCBI).

Inoltre, una proteina che consiste di una sequenza amminoacidica in cui uno o diversi amminoacidi vengono sostituiti, eliminati e/o aggiunti in qualsiasi delle sequenze amminoacidiche di TROP2 descritte sopra ed ha anche un'attività biologica equivalente a quella della proteina è anch'essa inclusa in TROP2.

La proteina TROP2 umana è costituita da una sequenza segnale composta da 26 residui amminoacidici aminoterminali, da un dominio extracellulare composto da 248 residui amminoacidici, da un dominio transmembrana costituito da 23 residui amminoacidici, e da un dominio intracellulare composto da 26 residui amminoacidici.

2. Produzione di un anticorpo anti-TROP2

L'anticorpo contro TROP2 dell'invenzione può essere ottenuto utilizzando un metodo solitamente realizzato nell'arte, il quale implica l'immunizzazione di un animale con TROP2 o con un polipeptide arbitrario scelto dalla sequenza amminoacidica di TROP2, e la raccolta e la purificazione dell'anticorpo prodotto in vivo. La specie biologica di TROP2 da utilizzare come antigene non è limitata all'uomo, ed un animale può essere immunizzato con TROP2 derivata da un animale diverso dall'uomo quale un topo od un ratto. In questo caso, esaminando la reattività incrociata tra un anticorpo che si lega alla TROP2 eterologa ottenuta e TROP2 umana, può essere scelto un anticorpo applicabile ad una malattia umana.

Inoltre, un anticorpo monoclonale può essere ottenuto da un ibridoma stabilito unendo cellule produttrici anticorpi che producono un anticorpo contro TROP2 con cellule di mieloma secondo un metodo noto (per esempio Kohler

e Milstein, Nature, (1975) 256, pagine da 495 a 497; a cura di Kennet, R., Monoclonal Antibodies, pagine da 365 a 367, Plenum Press, N.Y. (1980)).

TROP2 da utilizzare come antigene può essere ottenuta esprimendo il gene di TROP2 in una cellula ospite utilizzando l'ingegneria genetica.

5 Specificamente, viene prodotto un vettore in grado di esprimere il gene di TROP2, ed il vettore risultante viene trasfettato in una cellula ospite per esprimere il gene, e quindi, la TROP2 espressa viene purificata.

In alternativa, le cellule esprimenti TROP2 ingegnerizzate geneticamente descritte sopra od una linea cellulare esprimente TROP2 possono essere utilizzate come proteina TROP2. In seguito, viene descritto specificamente un metodo per ottenere un anticorpo contro TROP2.

10 (1) Preparazione dell'antigene

Esempi dell'antigene da utilizzare per produrre l'anticorpo anti-TROP2 includono TROP2, od un polipeptide composto da una sequenza amminoacidica parziale comprendente almeno 6 amminoacidi consecutivi di TROP2, od un derivato ottenuto aggiungendo a questa una data sequenza amminoacidica o veicolante.

15 TROP2 può essere purificata direttamente da tessuti tumorali umani o da cellule tumorali ed utilizzata. Inoltre, TROP2 può essere ottenuta sintetizzandola in vitro o producendola in una cellula ospite mediante l'ingegneria genetica.

In relazione all'ingegneria genetica, specificamente, dopo che il cDNA di TROP2 viene integrato in un vettore in grado di esprimere il cDNA di TROP2, l'antigene può essere ottenuto sintetizzandolo in una soluzione contenente un enzima, un substrato ed una sostanza energetica richiesta per la trascrizione e per la traduzione, od esprimendo TROP2 in un'altra cellula ospite procariotica od eucariotica trasformata.

20 Inoltre, l'antigene può anche essere ottenuto come proteina secretoria esprimendo una proteina di fusione ottenuta ligando il dominio extracellulare di TROP2, la quale è una proteina di membrana, alla regione costante di un anticorpo in un sistema ospite-vettore appropriato.

25 Il cDNA di TROP2 può essere ottenuto, per esempio, mediante un cosiddetto metodo di PCR in cui una reazione a catena della polimerasi (di seguito indicata come "PCR"; si veda Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, pagine da 487 a 489) viene eseguita utilizzando una libreria di cDNA esprimente cDNA di TROP2 come stampo ed inneschi che

amplificano specificamente il cDNA di TROP2.

Come sintesi in vitro del polipeptide, per esempio, può essere esemplificato, ma senza limitazione, il sistema di traduzione rapida (RTS) prodotto da Roche Diagnostics, Inc.

5 Esempi delle cellule ospiti procariotiche includono *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Allo scopo di trasformare le cellule ospiti con un gene bersaglio, le cellule ospiti vengono trasformate mediante un vettore plasmidico comprendente un replicone, cioè, un'origine di replicazione derivata da una specie compatibile con l'ospite, ed una sequenza di regolazione. Inoltre, il vettore ha preferibilmente una sequenza in grado di imporre selettività fenotipica sulla cellula trasformata.

10 Esempi delle cellule ospiti eucariotiche includono cellule di vertebrati, cellule di insetto, e cellule di lievito. Come cellule di vertebrati vengono spesso utilizzate, per esempio, cellule COS di scimmia (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pagine da 175 a 182, ATCC CRL-1650; ATCC: American Type Culture Collection), fibroblasti di topo NIH3T3 (numero di ATCC CRL-1658), e ceppi carenti della diidrofolato reduttasi (Urlaub, G. e Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pagine da 4126 a 4220) di cellule ovariche di criceto cinese (cellule di CHO; ATCC: CCL-61); e simili, tuttavia, le cellule non sono limitate a queste.

15 Il trasformato così ottenuto può essere sottoposto a coltura secondo un metodo solitamente realizzato nell'arte, e mediante la sottoposizione a coltura del trasformato, un polipeptide bersaglio viene prodotto a livello intracellulare od extracellulare.

20 Un terreno adatto da utilizzare per la sottoposizione a coltura può essere scelto da parte di coloro che sono esperti nell'arte da vari terreni di coltura comunemente utilizzati in relazione alle cellule ospiti impiegate. Se viene impiegato *Escherichia coli*, per esempio, può essere utilizzato un terreno LB arricchito con un antibiotico quale ampicillina od IPMG come richiesto.

Una proteina ricombinante prodotta a livello intracellulare od extracellulare mediante il trasformato attraverso tale sottoposizione a coltura può essere separata e purificata mediante qualsiasi di vari metodi di separazione noti utilizzando le proprietà fisiche o chimiche della proteina.

25 Esempi specifici dei metodi includono il trattamento con un comune precipitante delle proteine, con

ultrafiltrazione, con vari tipi di cromatografia liquida quali la cromatografia con setacci molecolari (permeazione su gel), la cromatografia di adsorbimento, la cromatografia a scambio ionico, e la cromatografia di affinità, con dialisi, e con una loro combinazione.

5 Inoltre, attaccando un'etichetta di sei residui di istidina ad una proteina ricombinante da esprimere, la proteina può essere efficientemente purificata con una colonna di affinità per il nichel. In alternativa, attaccando la regione Fc dell'IgG ad una proteina ricombinante da esprimere, la proteina può essere efficientemente purificata con una colonna con la proteina A.

Combinando i metodi descritti sopra, una quantità elevata di un polipeptide bersaglio può essere facilmente prodotta con una resa elevata e con una purezza elevata.

10 Il trasformato stesso descritto sopra può anch'esso essere utilizzato come antigene. In alternativa, una linea cellulare esprimente TROP2 può essere utilizzata come antigene. Esempi di una tale linea cellulare possono includere linee umane di cancro del polmone NCI-H322, PC14, NCIH-H2122, ed LCAM1, una linea umana di cancro della prostata PC3, linee umane di cancro del pancreas BxPC-3, Capan-1, e PK-1, una linea umana di cancro dell'ovaio SKOV3, ed una linea umana di cancro del colon-retto COLO205, sebbene la linea cellulare secondo la presente invenzione non sia
15 limitata a queste linee cellulari purché esprimente TROP2.

(2) Produzione di un anticorpo monoclonale anti-TROP2

Esempi dell'anticorpo che si legano specificamente a TROP2 includono un anticorpo monoclonale che si lega specificamente a TROP2, ed un metodo per ottenere tale anticorpo è come descritto sotto.

La produzione di un anticorpo monoclonale richiede in generale i seguenti passaggi operativi di:

- 20 (a) purificazione di un biopolimero da utilizzare come antigene, o preparazione di cellule esprimenti un antigene;
(b) preparazione di cellule che producono anticorpi immunizzando un animale mediante iniezione dell'antigene, raccolta del sangue, analisi del suo titolo anticorpale per determinare quando la milza viene asportata;
(c) preparazione di cellule di mieloma (di seguito indicate come "mieloma");
(d) fusione delle cellule che producono anticorpi con il mieloma;
25 (e) esame di un gruppo di ibridomi che producono un anticorpo desiderato;

(f) divisione degli ibridomi in cloni da singola cellula (clonaggio);

(g) facoltativamente, sottoposizione a coltura dell'ibridoma od allevamento di un animale a cui è stato impiantato l'ibridoma per produrre una quantità elevata di anticorpo monoclonale;

5 (h) esame dell'anticorpo monoclonale così prodotto per l'attività biologica e per la specificità di legame, od esame dello stesso per le proprietà come reagente marcato; e simili.

In seguito, il metodo per produrre un anticorpo monoclonale verrà descritto in dettaglio seguendo i passaggi di cui sopra, tuttavia, il metodo non è limitato a questi e, per esempio, possono essere utilizzate cellule che producono anticorpi diverse dalle cellule della milza e di mieloma.

(a) Purificazione dell'antigene

10 Come antigene, può essere utilizzata TROP2 preparata mediante il metodo come descritto sopra od un suo peptide parziale.

15 Inoltre, una frazione di membrana preparata dalle cellule ricombinanti esprimenti TROP2 o le cellule ricombinanti esprimenti TROP2 stesse, ed anche un peptide parziale della proteina dell'invenzione sintetizzato chimicamente mediante un metodo noto a coloro che sono esperti nell'arte possono anch'essi essere utilizzati come antigene.

Inoltre, una linea cellulare esprimente TROP2 può anch'essa essere utilizzata come antigene.

(b) Preparazione di cellule che producono anticorpi

20 L'antigene ottenuto nel passaggio (a) viene miscelato con un adiuvante quale un adiuvante completo od incompleto di Freund o con un agente ausiliario quale solfato di alluminio e potassio e la miscela risultante viene utilizzata come immunogeno per immunizzare un animale da esperimento. In un metodo alternativo, l'animale da esperimento è immunizzato con le cellule esprimenti un antigene come immunogeno. Come animale da esperimento, qualsiasi animale utilizzato in un metodo di produzione di ibridomi noto può essere utilizzato senza impedimento. Specificamente, per esempio, possono essere utilizzati un topo, un ratto, una capra, una pecora, un bovino, un cavallo, o simili. Tuttavia, dal
25 punto di vista della facilità di disponibilità di cellule di mieloma da fondere con le cellule estratte che producono anticorpi, viene utilizzato preferibilmente un topo od un ratto come animale da immunizzare.

Inoltre, il ceppo da utilizzare di un topo o di un ratto non è particolarmente limitato, e nel caso di un topo, per esempio, possono essere utilizzati vari ceppi quali A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, e 129 e simili, e nel caso di un ratto, per esempio, possono essere utilizzati Wistar, Low, Lewis, Sprague, Dawley, ACI, BN, Fischer e simili.

5 Questi topi e ratti possono essere ottenuti da allevatori/distributori di animali da esperimento, per esempio, CLEA Japan, Inc. e Charles River Laboratories Japan, Inc.

In considerazione della compatibilità di fusione con le cellule di mieloma descritte sotto, nel caso di un topo, il ceppo BALB/c, e nel caso di un ratto, i ceppi Wistar e Low sono particolarmente preferiti come animale da immunizzare.

10 Inoltre, in considerazione dell'omologia antigenica tra uomo e topi, è anche preferito utilizzare un topo avente una funzione biologica ridotta per rimuovere gli autoanticorpi, cioè, un topo con una malattia autoimmune.

L'età di tale topo o ratto al momento dell'immunizzazione è preferibilmente da 5 a 12 settimane di età, più preferibilmente da 6 ad 8 settimane di età.

15 Allo scopo di immunizzare un animale con TROP2 o con un suo ricombinante, per esempio, può essere utilizzato un metodo noto descritto in dettaglio, per esempio, in Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology volumi I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); in Kabat, E. A. e Mayer, M. M., Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) o simili.

Tra questi metodi di immunizzazione, un metodo specifico preferito nella presente invenzione è, per esempio, come segue.

20 Cioè, prima, una frazione di proteina di membrana che serve come antigene o cellule indotte ad esprimere l'antigene è/sono somministrata/e per via intradermica o per via intraperitoneale ad un animale. Tuttavia, la combinazione di entrambe le vie di somministrazione si preferisce per aumentare l'efficienza di immunizzazione, e quando una somministrazione intradermica viene eseguita nella prima metà ed una somministrazione intraperitoneale viene eseguita nella seconda metà o solo all'ultimo dosaggio, l'efficienza di immunizzazione può essere particolarmente aumentata.

25 Il programma di somministrazione dell'antigene varia in relazione al tipo di animale da immunizzare, alla differenza individuale o simili. Tuttavia, in generale, si preferisce un programma di somministrazione in cui la frequenza

di somministrazione dell'antigene è da 3 a 6 volte e l'intervallo di dosaggio è da 2 a 6 settimane, ed è più preferito un programma di somministrazione in cui la frequenza di somministrazione dell'antigene è da 3 a 4 volte e l'intervallo di dosaggio è da 2 a 4 settimane.

5 Inoltre, la dose dell'antigene varia in relazione al tipo di animale, alle differenze individuali o simili, tuttavia, la dose è in generale regolata da 0,05 mg a 5 mg, preferibilmente circa da 0,1 mg a 0,5 mg.

Un'immunizzazione di richiamo viene eseguita da 1 a 6 settimane, preferibilmente da 1 a 4 settimane, più preferibilmente da 1 a 3 settimane dopo la somministrazione dell'antigene come descritta sopra. Quando l'immunogeno è rappresentato da cellule, vengono impiegate da 1×10^6 ad 1×10^7 cellule.

10 La dose dell'antigene al tempo di eseguire l'immunizzazione di richiamo varia in relazione al tipo od alla dimensione dell'animale o simili, tuttavia, nel caso, per esempio, di un topo, la dose è in generale regolata da 0,05 mg a 5 mg, preferibilmente da 0,1 mg a 0,5 mg, più preferibilmente circa da 0,1 mg a 0,2 mg. Quando l'immunogeno è rappresentato da cellule, vengono impiegate da 1×10^6 ad 1×10^7 cellule.

15 Cellule della milza o linfociti comprese cellule che producono anticorpi sono rimossi in modo asettico dall'animale immunizzato da 1 a 10 giorni, preferibilmente da 2 a 5 giorni, più preferibilmente da 2 a 3 giorni dopo l'immunizzazione di richiamo. A questo punto, il titolo anticorpale viene misurato, e se un animale avente un titolo anticorpale sufficientemente aumentato viene utilizzato come fonte di approvvigionamento delle cellule che producono anticorpi, la procedura successiva può essere realizzata più efficientemente.

20 Esempi del metodo per misurare il titolo anticorpale da utilizzare qui includono un metodo RIA ed un metodo ELISA, ma il metodo non è limitato a questi. Per esempio, se viene impiegato un metodo ELISA, la misurazione del titolo anticorpale nell'invenzione può essere realizzata secondo le procedure come descritte sotto.

25 Innanzitutto, un antigene purificato o parzialmente purificato viene adsorbito sulla superficie di una fase solida quale una piastra per ELISA da 96 pozzetti, e la superficie della fase solida che non ha ivi adsorbito alcun antigene viene coperta con una proteina non correlata all'antigene quale albumina sierica bovina (BSA). Dopo il lavaggio della superficie, la superficie è portata a contatto con un campione diluito in serie (per esempio siero di topo) come anticorpo primario per permettere all'anticorpo nel campione di legarsi all'antigene.

Inoltre, come anticorpo secondario, un anticorpo marcato con un enzima contro un anticorpo di topo viene aggiunto e viene fatto legare all'anticorpo di topo. Dopo il lavaggio, viene aggiunto un substrato per l'enzima e viene misurata una variazione di assorbanza che avviene a causa dello sviluppo di colore indotto dalla degradazione del substrato o simili ed il titolo anticorpale viene calcolato sulla base della misurazione.

5 La separazione delle cellule che producono anticorpi dalle cellule della milza o dai linfociti dell'animale immunizzato può essere realizzata secondo un metodo noto (per esempio Kohler et al., Nature (1975), 256, pagina 495; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977), 6, pagina 511; Milstein et al., Nature (1977), 266, pagina 550; Walsh, Nature (1977), 266, pagina 495). Per esempio, nel caso delle cellule della milza, può essere impiegato un metodo generale in cui
10 le cellule che producono anticorpi vengono separate omogeneizzando la milza per ottenere le cellule attraverso la filtrazione con una maglia di acciaio inossidabile e sospendendo le cellule in terreno minimo essenziale di Eagle (MEM).
(c) Preparazione di cellule di mieloma (di seguito indicate come "mieloma")

15 Le cellule di mieloma da utilizzare per la fusione cellulare non sono particolarmente limitate e cellule adatte possono essere scelte tra linee cellulari note. Tuttavia, in considerazione della convenienza quando un ibridoma viene scelto tra cellule fuse, si preferisce utilizzare un ceppo carente di HGPRT (ipoxantina-guanina fosforibosil transferasi) la cui procedura di selezione è stata stabilita.

20 Più specificamente, esempi del ceppo carente di HGPRT includono X63-Ag8(X63), NS1-ANS/1(NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), FO, S149/5XXO, e BU.1 derivati dai topi; 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3) derivato dai ratti; ed U266AR(SKO-007), GM1500-GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) ed 8226AR/NIP4-1(NP41) derivati dall'uomo. Questi ceppi carenti di HGPRT
20 sono disponibili, per esempio, da ATCC o simili.

25 Questi ceppi di cellule vengono sottoposti a sottocoltura in un terreno appropriato quale un terreno con 8-azaguanina (un terreno ottenuto aggiungendo 8-azaguanina ad un terreno RPMI 1640 arricchito con glutammina, 2-mercaptoetanolo, gentamicina, e siero fetale di vitello (di seguito indicato come "FBS")), un terreno di Dulbecco modificato da Iscove (IMDM), od un terreno di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM). In questo caso, da 3 a 4 giorni
25 prima di eseguire la fusione cellulare, le cellule vengono sottoposte a sottocoltura in un terreno normale (per esempio un

terreno ASF104 (prodotto da Ajinomoto Co., Ltd.) contenente FCS al 10%) per garantire non meno di 2×10^7 cellule il giorno della fusione cellulare.

(d) Fusione cellulare

5 La fusione tra le cellule che producono anticorpi e le cellule di mieloma può essere appropriatamente eseguita secondo un metodo noto (Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology volumi I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. e Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), ecc.), in condizioni tali che il tasso di sopravvivenza delle cellule non sia eccessivamente ridotto.

10 Come tale metodo, per esempio, può essere utilizzato un metodo chimico in cui le cellule che producono anticorpi e le cellule di mieloma vengono miscelate in una soluzione contenente un polimero quale polietilenglicole ad una concentrazione elevata, un metodo fisico che utilizza la stimolazione elettrica, o simili. Tra questi metodi, un esempio specifico del metodo chimico è come descritto sotto.

15 Cioè, nel caso in cui si utilizzi polietilenglicole nella soluzione contenente un polimero ad una concentrazione elevata, le cellule che producono anticorpi e le cellule di mieloma vengono miscelate in una soluzione di polietilenglicole avente un peso molecolare da 1.500 a 6.000, più preferibilmente da 2.000 a 4.000 ad una temperatura da 30°C a 40°C, preferibilmente da 35° a 38°C per da 1 fino a 10 minuti, preferibilmente da 5 ad 8 minuti.

(e) Selezione di un gruppo di ibridomi

20 Il metodo per selezionare gli ibridomi ottenuti mediante la fusione cellulare descritta sopra non è particolarmente limitato. Di solito, viene utilizzato un metodo di selezione con HAT (ipoxantina, amminopterina, timidina) (Kohler et al., Nature (1975), 256, pagina 495; Milstein et al., Nature (1977), 266, pagina 550).

Questo metodo è efficace quando vengono ottenuti ibridomi utilizzando le cellule di mieloma di un ceppo carente di HGPRT che non può sopravvivere in presenza di amminopterina. Vale a dire, coltivando cellule non fuse ed ibridomi in un terreno HAT, solo agli ibridomi resistenti all'amminopterina è selettivamente permesso di sopravvivere e di proliferare.

(f) Divisione in un clone da singola cellula (clonaggio)

Come metodo di clonaggio per gli ibridomi, può essere utilizzato un metodo noto come un metodo con la metilcellulosa, un metodo con agar molle, od un metodo delle diluizioni limite (si veda, per esempio, Barbara, B. M. e Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Tra questi metodi, in particolare, si preferisce un metodo di coltura tridimensionale quale un metodo con la metilcellulosa. Per esempio, il gruppo di ibridomi prodotti dalla fusione cellulare viene sospeso in un terreno con metilcellulosa quale terreno di selezione D ClonaCell-HY (prodotto da StemCell Technologies, Inc., #03804) e sottoposto a coltura. Quindi, vengono raccolte le colonie di ibridomi formate, con cui possono essere ottenuti ibridomi monoclonali. Le rispettive colonie di ibridomi raccolte vengono sottoposte a coltura, ed un ibridoma che è stato confermato avere un titolo anticorpale stabile in un surnatante della coltura di ibridomi ottenuta viene scelto come ceppo di ibridoma che produce un anticorpo monoclonale per TROP2.

Esempi del ceppo di ibridoma così stabilito includono l'ibridoma di TROP2 TINA1. In questa descrizione, un anticorpo prodotto dall'ibridoma di TROP2 TINA1 viene indicato come "anticorpo TINA1" o semplicemente "TINA1".

La regione variabile della catena pesante dell'anticorpo TINA1 ha una sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 2 nell'elenco delle sequenze. Inoltre, la regione variabile della catena leggera dell'anticorpo TINA1 ha una sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 4 nell'elenco delle sequenze.

(g) Preparazione dell'anticorpo monoclonale coltivando un ibridoma

Coltivando l'ibridoma così scelto, può essere efficientemente ottenuto un anticorpo monoclonale. Tuttavia, prima della sottoposizione a coltura, si preferisce eseguire un esame di un ibridoma che produce un anticorpo monoclonale bersaglio.

In tale esame, può essere impiegato un metodo noto.

La misurazione del titolo anticorpale nell'invenzione può essere realizzata, per esempio, mediante un metodo ELISA spiegato nell'articolo (b) descritto sopra.

L'ibridoma ottenuto mediante il metodo descritto sopra può essere conservato in uno stato congelato in atmosfera di azoto liquido oppure in un congelatore ad una temperatura di -80°C od inferiore.

Dopo il completamento del clonaggio, il terreno viene sostituito da un terreno HT ad un terreno normale, e l'ibridoma viene sottoposto a coltura.

Una coltura su larga scala viene eseguita mediante una coltura con rotazione utilizzando una grande bottiglia per coltura o mediante una coltura in agitatore. Dal surnatante ottenuto mediante la coltura su larga scala, un anticorpo monoclonale che si lega specificamente alla proteina dell'invenzione può essere ottenuto mediante purificazione utilizzando un metodo noto a coloro che sono esperti nell'arte quale la permeazione su gel.

Inoltre, l'ibridoma viene iniettato nella cavità addominale di un topo dello stesso ceppo dell'ibridoma (per esempio il BALB/c descritto sopra) o di un topo Nu/Nu per far proliferare l'ibridoma, per mezzo del quale può essere ottenuto l'ascite contenente una quantità elevata dell'anticorpo monoclonale dell'invenzione.

10 Nel caso in cui l'ibridoma venga somministrato nella cavità addominale, se un olio minerale quale 2,6,10,14-tetrametil pentadecano (pristano) viene somministrato da 3 a 7 giorni prima di questo, può essere ottenuta una quantità superiore dell'ascite.

15 Per esempio, un immunosoppressore viene precedentemente iniettato nella cavità addominale di un topo dello stesso ceppo dell'ibridoma per inattivare i linfociti T. 20 giorni più tardi, da 10^6 a 10^7 cellule cloni dell'ibridoma vengono sospese in un terreno privo di siero (0,5 ml) e la sospensione viene somministrata nella cavità addominale del topo. In generale, quando l'addome viene espanso e riempito con l'ascite, l'ascite viene raccolto dal topo. Mediante questo metodo, l'anticorpo monoclonale può essere ottenuto ad una concentrazione che è circa 100 volte o molto superiore a quella nella soluzione di coltura.

20 L'anticorpo monoclonale ottenuto mediante il metodo descritto sopra può essere purificato mediante un metodo descritto, per esempio, in Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology volumi I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

L'anticorpo monoclonale così ottenuto ha un'elevata specificità antigenica per TROP2.

(h) Saggio dell'anticorpo monoclonale

L'isotipo e la sottoclasse dell'anticorpo monoclonale così ottenuto possono essere determinati come segue.

25 Innanzitutto, esempi del metodo di identificazione includono un metodo di Ouchterlony, un metodo ELISA, ed

un metodo RIA.

Un metodo di Ouchterlony è semplice, ma quando la concentrazione dell'anticorpo monoclonale è bassa, è richiesta un'operazione di condensazione.

5 D'altra parte, quando viene utilizzato un metodo ELISA od un metodo RIA, facendo reagire direttamente il surnatante della coltura con una fase solida che ha adsorbito l'antigene ed utilizzando anticorpi corrispondenti a vari tipi di isotipi e sottoclassi immunoglobulinici come anticorpi secondari, l'isotipo e la sottoclasse dell'anticorpo monoclonale possono essere identificati.

Inoltre, come metodo più semplice, possono anche essere utilizzati un kit di identificazione disponibile in commercio (per esempio Mouse Typer Kit prodotto da Bio-Rad Laboratories, Inc.) o simili.

10 Inoltre, la determinazione quantitativa di una proteina può essere eseguita mediante il metodo di Folin-Lowry ed un metodo di calcolo basato sull'assorbanza a 280 nm ($1,4 \text{ (OD 280)} = \text{immunoglobulina 1 mg/ml}$).

15 Inoltre, anche quando l'anticorpo monoclonale viene ottenuto separatamente ed indipendentemente eseguendo ancora i passaggi da (a) ad (h) in (2), è possibile ottenere un anticorpo avente un'attività citotossica equivalente a quella dell'anticorpo TINA1. Come esempio di un tale anticorpo, può essere esemplificato un anticorpo che si lega allo stesso epitopo dell'anticorpo TINA1. Se un anticorpo monoclonale recentemente prodotto si lega ad un peptide parziale o ad una struttura terziaria parziale a cui si lega l'anticorpo TINA1, può essere determinato che l'anticorpo monoclonale si lega allo stesso epitopo dell'anticorpo TINA1. Inoltre, confermando che l'anticorpo monoclonale compete con l'anticorpo TINA1 per il legame a TROP2 (cioè, l'anticorpo monoclonale inibisce il legame tra l'anticorpo TINA1 e TROP2), può essere determinato che l'anticorpo monoclonale si lega allo stesso epitopo dell'anticorpo anti-TROP2 anche se la sequenza o la struttura specifica dell'epitopo non è stata determinata. Quando è confermato che l'anticorpo monoclonale si lega allo stesso epitopo dell'anticorpo anti-TROP2, si attende fortemente che l'anticorpo monoclonale abbia l'affinità di legame per l'antigene ed un'attività biologica equivalenti a quelle dell'anticorpo TINA1.

(3) Altri anticorpi

25 L'anticorpo dell'invenzione non comprende solo l'anticorpo monoclonale contro TROP2 descritto sopra ma anche un anticorpo ricombinante ottenuto mediante modificazione artificiale allo scopo di diminuire l'antigenicità

eterologa all'uomo quale un anticorpo chimerico, un anticorpo umanizzato ed un anticorpo umano. Questi anticorpi possono essere prodotti utilizzando un metodo noto.

Come anticorpo chimerico, può essere esemplificato un anticorpo in cui le regioni anticorpali variabili e costanti sono derivate da specie differenti, per esempio, un anticorpo chimerico in cui una regione anticorpale variabile derivata da topo o da ratto è connessa ad una regione anticorpale costante derivata dall'uomo (si veda Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, da 6851 a 6855, (1984)).

Come anticorpo umanizzato, possono essere esemplificati un anticorpo ottenuto integrando solo una regione determinante la complementarità (CDR) in un anticorpo di derivazione umana (si veda Nature (1986) 321, pagine da 522 a 525), ed un anticorpo ottenuto innestando una parte dei residui amminoacidici della sequenza cornice così come della sequenza delle CDR ad un anticorpo umano mediante un metodo di innesto di CDR (pubblicazione internazionale WO 90/07861).

Tuttavia, l'anticorpo umanizzato derivato dall'anticorpo TINA1 non è limitato ad uno specifico anticorpo umanizzato purché l'anticorpo umanizzato abbia tutti i 6 tipi di sequenze delle CDR dell'anticorpo TINA1. La regione variabile della catena pesante dell'anticorpo TINA1 ha CDRH1 (TAGMQ) composta da una sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 23 nell'elenco delle sequenze, CDRH2 (WINTHSGVPKYAEDFKG) composta da una sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 24 nell'elenco delle sequenze, e CDRH3 (SGFGSSYWFYFDV) composta da una sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 25 nell'elenco delle sequenze. Inoltre, la regione variabile della catena leggera dell'anticorpo TINA1 ha CDRL1 (KASQDVSTAVA) composta da una sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 26 nell'elenco delle sequenze, CDRL2 (SASYRYT) composta da una sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 27 nell'elenco delle sequenze, e CDRL3 (QQHYITPLT) composta da una sequenza amminoacidica rappresentata dalla SEQ ID NO: 28 nell'elenco delle sequenze.

Come esempio dell'anticorpo umanizzato di un anticorpo murino TINA1, può essere esemplificata una combinazione arbitraria di una catena pesante comprendente una regione variabile della catena pesante composta da una qualsiasi tra (1) una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 20 a 140 delle SEQ ID NO: 12, 14, o 16 nell'elenco delle sequenze, (2) una sequenza amminoacidica avente un'omologia di almeno il 95% o più con la

sequenza amminoacidica (1) descritta sopra, e (3) una sequenza amminoacidica in cui uno o diversi amminoacidi nella sequenza amminoacidica (1) descritta sopra vengono eliminati, sostituiti od aggiunti ed una catena leggera comprendente una regione variabile della catena leggera composta da una qualsiasi tra (4) una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 21 a 129 delle SEQ ID NO: 18, 20, o 22 nell'elenco delle sequenze, (5) una sequenza
5 amminoacidica avente un'omologia di almeno il 95% o più con la sequenza amminoacidica (4) descritta sopra, e (6) una sequenza amminoacidica in cui uno o diversi amminoacidi nella sequenza amminoacidica (4) descritta sopra vengono eliminati, sostituiti od aggiunti.

Il termine "diversi" come qui utilizzato si riferisce a da 1 a 10, da 1 a 9, da 1 ad 8, da 1 a 7, da 1 a 6, da 1 a 5, da 1 a 4, da 1 a 3, o ad 1 oppure a 2.

10 Come sostituzione amminoacidica in questa descrizione, si preferisce una sostituzione amminoacidica conservativa. La sostituzione amminoacidica conservativa si riferisce ad una sostituzione che avviene all'interno di un gruppo di amminoacidi in relazione alle catene amminoacidiche laterali. Gruppi amminoacidici preferiti sono i seguenti: un gruppo acido (acido aspartico ed acido glutammico); un gruppo basico (lisina, arginina ed istidina); un gruppo non polare (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, e triptofano); ed una famiglia polare non
15 carica (glicina, asparagina, glutammina, cisteina, serina, treonina, e tirosina). Gruppi amminoacidici più preferiti sono i seguenti: un gruppo idrossialifatico (serina e treonina); un gruppo contenente ammidi (asparagina e glutammina); un gruppo alifatico (alanina, valina, leucina, ed isoleucina); ed un gruppo aromatico (fenilalanina, triptofano, e tirosina). Una tale sostituzione amminoacidica viene eseguita preferibilmente in un intervallo che non danneggia le proprietà di una sostanza avente la sequenza amminoacidica originale.

20 Come anticorpo che ha una combinazione preferita di una catena pesante ed una catena leggera descritta sopra, possono essere esemplificati un anticorpo composto da una catena pesante comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni
25 amminoacidiche da 21 a 129 della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 della

SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 della SEQ ID NO: 20; un anticorpo composto da una catena pesante comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 della SEQ ID NO: 22; un anticorpo composto da una catena pesante comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 della SEQ ID NO: 20; un anticorpo composto da una catena pesante comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 della SEQ ID NO: 22; un anticorpo composto da una catena pesante comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 della SEQ ID NO: 20; ed un anticorpo composto da una catena pesante comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 140 della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 129 della SEQ ID NO: 22.

Inoltre, come anticorpo che ha una combinazione più preferita di una catena pesante ed una catena leggera descritta sopra, possono essere esemplificati un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 18;

5 un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 20; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234

10 della SEQ ID NO: 22; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 20; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 22; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica

20 composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 20; ed un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 22.

25

Come anticorpo che ha una combinazione preferita migliore di una catena pesante ed una catena leggera descritta sopra, possono essere esemplificati un anticorpo composto da una catena pesante comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 20 a 140 della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 21 a 129 della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 20 a 140 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 21 a 129 della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 20 a 140 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 21 a 129 della SEQ ID NO: 20; ed un anticorpo composto da una catena pesante comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 20 a 140 della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera comprendente una regione variabile composta da una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 21 a 129 della SEQ ID NO: 22.

Inoltre, come anticorpo che ha un'altra combinazione più preferita di una catena pesante ed una catena leggera descritta sopra, possono essere esemplificati un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 20; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 22; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 20; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta da una sequenza

amminoacidica della SEQ ID NO: 22; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 20; ed un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 22.

Come anticorpo che ha una combinazione preferita migliore di una catena pesante ed una catena leggera descritta sopra, possono essere esemplificati un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 20; ed un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 470 della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 22.

Inoltre, come anticorpo che ha una combinazione superiore più preferita di una catena pesante ed una catena leggera descritta sopra, possono essere esemplificati un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 469 della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 469 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 18; un anticorpo composto da una catena pesante

composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 469 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 20; ed un anticorpo composto da una catena pesante composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 20 a 469 della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera composta da una sequenza amminoacidica composta dalle posizioni amminoacidiche da 21 a 234 della SEQ ID NO: 22.

Combinando una sequenza avente un'omologia elevata con la sequenza amminoacidica della catena pesante descritta sopra con una sequenza avente un'omologia elevata con la sequenza amminoacidica della catena leggera descritta sopra, è possibile selezionare un anticorpo avente un'attività biologica equivalente a quella di ciascuno degli anticorpi descritti sopra. Una tale omologia è in generale un'omologia dell'80% o superiore, preferibilmente un'omologia del 90% o superiore, più preferibilmente un'omologia del 95% o superiore, il più preferibilmente un'omologia del 99% o superiore. Inoltre, anche combinando una sequenza amminoacidica in cui da uno a diversi residui amminoacidici vengono sostituiti, eliminati od aggiunti nella sequenza amminoacidica della catena pesante o della catena leggera, è possibile selezionare un anticorpo avente un'attività biologica equivalente a quella di ciascuno degli anticorpi descritti sopra.

L'omologia tra due sequenze amminoacidiche può essere determinata utilizzando i parametri preimpostati dell'algoritmo Blast versione 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, e David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST e PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: da 3389 a 3402). L'algoritmo Blast può essere utilizzato anche attraverso internet accedendo al sito www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.

Nella sequenza amminoacidica della catena pesante rappresentata dalle SEQ ID NO: 12, 14 o 16 nell'elenco delle sequenze, una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 1 a 19 è una sequenza segnale, una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 20 a 140 è una regione variabile, ed una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 141 a 470 è una regione costante. Le sequenze delle SEQ ID NO: 12, 14 e 16 vengono mostrate nelle figure 3, 4 e 5 rispettivamente.

Inoltre, nella sequenza amminoacidica della catena leggera rappresentata dalle SEQ ID NO: 18, 20 o 22

nell'elenco delle sequenze, una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 1 a 20 è una sequenza segnale, una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 21 a 129 è una regione variabile, ed una sequenza amminoacidica composta dai residui amminoacidici da 130 a 234 è una regione costante. Le sequenze delle SEQ ID NO: 18, 20 e 22 vengono mostrate nelle figure 6, 7 e 8 rispettivamente.

5 Inoltre, l'anticorpo dell'invenzione comprende un anticorpo umano che si lega a TROP2. Un anticorpo umano anti-TROP2 si riferisce ad un anticorpo umano avente solo una sequenza di un anticorpo derivata da un cromosoma umano. L'anticorpo umano anti-TROP2 può essere ottenuto mediante un metodo che utilizza un topo che produce anticorpi umani avente un frammento di cromosoma umano comprendente i geni delle catene pesanti e leggere di un anticorpo umano (si vedano Tomizuka, K. et al., *Nature Genetics* (1997) 16, pagine da 133 a 143; Kuroiwa, Y. et al.,
10 *Nucl. Acids Res.* (1998) 26, pagine da 3447 a 3448; Yoshida, H. et al., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* volume 10, pagine da 69 a 73 (a cura di Kitagawa, Y., Matuda, T. e Iijima, S.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, pagine da 722 a 727, ecc.).

15 Un tale topo che produce anticorpi umani può essere generato specificamente come segue. Un animale geneticamente modificato in cui i loci dei geni immunoglobulinici endogeni delle catene pesanti e leggere sono stati distrutti, ed invece, i loci dei geni immunoglobulinici umani delle catene pesanti e leggere sono stati introdotti attraverso un vettore di cromosoma artificiale di lievito (YAC) o simili è generato producendo un animale knock-out ed un animale transgenico ed accoppiando questi animali.

20 Inoltre, secondo una tecnica del DNA ricombinante, utilizzando cDNA codificanti ciascuno per una tale catena pesante e per una tale catena leggera di un anticorpo umano, e preferibilmente un vettore comprendente tali cDNA, le cellule eucariotiche vengono trasformate, ed una cellula trasformante che produce un anticorpo monoclonale umano ricombinante viene sottoposta a coltura, per mezzo della quale l'anticorpo può anche essere ottenuto dal surnatante della coltura.

 Qui, come ospite, possono essere utilizzate, per esempio, cellule eucariotiche, preferibilmente cellule di mammifero quali cellule di CHO, linfociti, o cellule di mieloma.

25 Inoltre, è anche noto un metodo per ottenere un anticorpo umano derivato da esposizione fagica scelto tra una

libreria di anticorpi umani (si vedano Wormstone, I. M. et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. (2002) 43 (7), pagine da 2301 a 2308; Carmen, S. et al., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), pagine da 189 a 203; Siriwardena, D. et al., *Ophthalmology* (2002) 109 (3), pagine da 427 a 431, ecc.).

5 Per esempio, può essere utilizzato un metodo di esposizione fagica in cui una regione variabile di un anticorpo umano è espressa sulla superficie di un fago come anticorpo a catena singola (scFv), e viene scelto un fago che si lega ad un antigene (*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9), pagine da 1105 a 1116).

Analizzando il gene del fago scelto in base al legame ad un antigene, può essere determinata una sequenza di DNA codificante per la regione variabile di un anticorpo umano che si lega ad un antigene.

10 Se la sequenza di DNA di scFv che si lega ad un antigene viene determinata, un anticorpo umano può essere ottenuto preparando un vettore di espressione comprendente la sequenza ed introducendo il vettore in un ospite appropriato per esprimerlo (pubblicazioni internazionali WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388; *Annu. Rev. Immunol.* (1994) 12, pagine da 433 a 455; *Nature Biotechnology* (2005) 23 (9), pagine da 1105 a 1116).

15 Se un anticorpo umano recentemente prodotto si lega ad un peptide parziale o ad una struttura terziaria parziale a cui si lega l'anticorpo TINA1, può essere determinato che l'anticorpo umano si lega allo stesso epitopo dell'anticorpo TINA1. Inoltre, confermando che l'anticorpo umano compete con l'anticorpo TINA1 per il legame a TROP2 (cioè, l'anticorpo umano inibisce il legame tra l'anticorpo TINA1 e TROP2), può essere determinato che l'anticorpo umano si lega allo stesso epitopo dell'anticorpo TINA1 anche se la sequenza o la struttura specifica dell'epitopo non è stata determinata. Quando è confermato che l'anticorpo umano si lega allo stesso epitopo dell'anticorpo TINA1, si attende
20 fortemente che l'anticorpo umano abbia un'attività biologica equivalente a quella dell'anticorpo TINA1.

Gli anticorpi chimerici, gli anticorpi umanizzati, o gli anticorpi umani ottenuti mediante il metodo descritto sopra sono valutati per la proprietà di legame ad un antigene mediante un metodo noto o simili, e può essere scelto un anticorpo preferito.

25 Come esempio di un altro indice per l'uso nel confronto delle proprietà degli anticorpi, può essere esemplificata la stabilità degli anticorpi. La calorimetria differenziale a scansione (DSC) è un dispositivo in grado di misurare

velocemente ed accuratamente una temperatura di punto medio di denaturazione termica (T_m) da utilizzare come indice favorevole della relativa stabilità conformazionale delle proteine. Misurando i valori di T_m utilizzando la DSC e confrontando i valori, può essere confrontata una differenza nella stabilità termica. È noto che la stabilità di conservazione degli anticorpi mostra qualche correlazione con la stabilità termica degli anticorpi (Lori Burton, et al., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, pagine da 265 a 273), e può essere scelto un anticorpo preferito utilizzando la stabilità termica come indice. Esempi di altri indici per selezionare anticorpi includono le seguenti caratteristiche: la resa in una cellula ospite appropriata è elevata; e l'aggregabilità in una soluzione acquosa è bassa. Per esempio, un anticorpo che mostra la resa massima non sempre mostra la stabilità termica massima, e quindi, è necessario selezionare un anticorpo maggiormente adatto per la somministrazione all'uomo facendo la valutazione completa sulla base degli indici descritti sopra.

Nella presente invenzione, è anche inclusa una variante modificata dell'anticorpo. La variante modificata si riferisce ad una variante ottenuta sottoponendo l'anticorpo della presente invenzione a modificazione chimica o biologica. Esempi della variante modificata chimicamente includono varianti modificate chimicamente legando un gruppo funzionale chimico ad uno scheletro amminoacidico, varianti modificate chimicamente con una catena di carboidrati legati ad N o legati ad O, ecc. Esempi della variante modificata biologicamente includono varianti ottenute mediante modificazione post-traduzionale (quali glicosilazione legata ad N o legata ad O, processamento aminotermiale o carbossiterminale, deammidazione, isomerizzazione dell'acido aspartico, od ossidazione della metionina), e varianti in cui un residuo di metionina è stato aggiunto all'estremità aminotermiale essendo espresse in una cellula ospite procariotica.

Inoltre, un anticorpo marcato in modo tale da permettere il rilevamento o l'isolamento dell'anticorpo o di un antigene dell'invenzione, per esempio, un anticorpo marcato con enzima, un anticorpo marcato con fluorescenza, ed un anticorpo marcato per affinità sono anch'essi inclusi nel significato di variante modificata. Una tale variante modificata dell'anticorpo dell'invenzione è utile per migliorare la stabilità e la ritenzione sanguigna dell'anticorpo, riducendo la sua antigenicità, rilevando od isolando un anticorpo od un antigene, e così via.

Inoltre, regolando la modificazione di un glicano che è legato all'anticorpo dell'invenzione (glicosilazione,

defucosilazione, ecc.), è possibile aumentare un'attività cellulare citotossica dipendente dagli anticorpi. Come tecnica per regolare la modificazione di un glicano degli anticorpi, sono note le pubblicazioni internazionali WO 1999/54342, WO 2000/61739, WO 2002/31140, ecc. Tuttavia, la tecnica non è limitata a questa. Nell'anticorpo della presente invenzione, è anche incluso un anticorpo in cui la modificazione di un glicano viene regolata.

5 Nel caso in cui un anticorpo venga prodotto isolando prima un gene anticorpale e quindi introducendo il gene in un ospite appropriato, può essere utilizzata una combinazione di un ospite appropriato ed un vettore di espressione appropriato. Esempi specifici del gene anticorpale includono una combinazione di un gene codificante per una sequenza della catena pesante di un anticorpo descritto in questa descrizione ed un gene codificante per una sequenza della sua catena leggera. Quando una cellula ospite viene trasformata, è possibile inserire il gene della sequenza della catena pesante ed il gene della sequenza della catena leggera nello stesso vettore di espressione, ed anche in differenti vettori di espressione separatamente.

10 Nel caso in cui le cellule eucariotiche vengano utilizzate come ospite, possono essere utilizzati cellule animali, cellule vegetali, e microrganismi eucariotici. Come cellule animali, possono essere esemplificate cellule di mammifero, per esempio, cellule COS di scimmia (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pagine da 175 a 182, ATCC CRL-1650), fibroblasti di topo NIH3T3 (numero di ATCC CRL-1658), e ceppi carenti della diidrofolato reduttasi (Urlaub, G. e Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pagine da 4126 a 4220) di cellule ovariche di criceto cinese (cellule di CHO; ATCC: CCL-61).

15 Nel caso in cui vengano utilizzate cellule procariotiche, per esempio, possono essere esemplificati Escherichia coli e Bacillus subtilis.

20 Introducendo un gene anticorpale desiderato in queste cellule attraverso trasformazione, e sottoponendo a coltura le cellule così trasformate in vitro, può essere ottenuto l'anticorpo. Nel metodo di coltura descritto sopra, la resa può qualche volta variare in relazione alla sequenza dell'anticorpo, e quindi, è possibile selezionare un anticorpo che viene facilmente prodotto come farmaceutico utilizzando la resa come indice tra gli anticorpi aventi un'attività di legame equivalente. Quindi, nell'anticorpo della presente invenzione, è anche incluso un anticorpo ottenuto mediante un metodo per produrre un anticorpo, caratterizzato dal comprendere un passaggio di sottoposizione a coltura della cellula ospite

25

trasformata ed un passaggio di raccolta di un anticorpo desiderato da un prodotto sottoposto a coltura ottenuto nel passaggio di sottoposizione a coltura.

È noto che un residuo di lisina all'estremità carbossiterminale della catena pesante di un anticorpo prodotto in una cellula di mammifero sottoposta a coltura viene eliminato (Journal of Chromatography A, 705: da 129 a 134 (1995)), ed è anche noto che due residui amminoacidici (glicina e lisina) all'estremità carbossiterminale della catena pesante di un anticorpo prodotto in una cellula di mammifero sottoposta a coltura vengono eliminati ed un residuo di prolina recentemente localizzato all'estremità carbossiterminale è ammidato (Analytical Biochemistry, 360: da 75 ad 83 (2007)). Tuttavia, tali delezione e modificazione della sequenza della catena pesante non influenzano l'affinità di legame per l'antigene e la funzione effettrice (l'attivazione di un complemento, la citotossicità cellulare dipendente dall'anticorpo, ecc.) dell'anticorpo. Quindi, nell'anticorpo secondo la presente invenzione, sono anche inclusi un anticorpo sottoposto a tale modificazione ed un frammento funzionale dell'anticorpo, e sono anche comprese una variante per delezione in cui uno o due amminoacidi sono stati eliminati all'estremità carbossiterminale della catena pesante, una variante ottenuta mediante ammidazione della variante per delezione (per esempio una catena pesante in cui il residuo di prolina carbossiterminale è stato ammidato) e simili. Il tipo di variante per delezione avente una delezione all'estremità carbossiterminale della catena pesante dell'anticorpo secondo l'invenzione non è limitato alle varianti di cui sopra purché vengano conservate l'affinità di legame per l'antigene e la funzione effettrice. Le due catene pesanti che costituiscono l'anticorpo secondo l'invenzione possono essere di un tipo scelto nel gruppo composto da una catena pesante a lunghezza intera e la variante per delezione descritta sopra, o possono essere di due tipi in una combinazione indifferenziata. Il rapporto della quantità di ciascuna variante per delezione può essere influenzato dal tipo di cellule di mammifero sottoposte a coltura che produce l'anticorpo secondo l'invenzione e dalle condizioni di coltura, tuttavia, può essere esemplificato un caso in cui un residuo amminoacidico all'estremità carbossiterminale è stato eliminato in entrambe le due catene pesanti contenute come componenti principali nell'anticorpo secondo l'invenzione.

Come isotipo dell'anticorpo dell'invenzione, per esempio, possono essere esemplificate le IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), e possono essere esemplificate preferibilmente IgG1 od IgG2.

Come attività biologica dell'anticorpo, in generale possono essere esemplificate un'attività di legame

all'antigene, un'attività di internalizzazione in cellule esprimenti un antigene legandosi all'antigene, un'attività di neutralizzazione dell'attività di un antigene, un'attività di aumento dell'attività di un antigene, un'attività di citotossicità cellulare dipendente dagli anticorpi (ADCC), un'attività di citotossicità dipendente dal complemento (CDC), ed un'attività di fagocitosi mediata da cellule dipendente dagli anticorpi (ADCP). La funzione dell'anticorpo della presente
5 invenzione è un'attività di legame a TROP2, preferibilmente un'attività di internalizzazione in cellule esprimenti TROP2 legandosi a TROP2. Inoltre, l'anticorpo della presente invenzione può avere un'attività di ADCC, un'attività di CDC, e/o un'attività di ADCP in aggiunta ad un'attività di internalizzazione cellulare.

L'anticorpo ottenuto può essere purificato all'omogeneità. La separazione e la purificazione dell'anticorpo possono essere eseguite impiegando un metodo convenzionale di separazione e di purificazione di proteine. Per esempio,
10 l'anticorpo può essere separato e purificato selezionando e combinando appropriatamente la cromatografia su colonna, la filtrazione mediante filtro, l'ultrafiltrazione, la precipitazione in sale, la dialisi, l'elettroforesi preparativa su gel di poliacrilammide, l'elettroforesi a focalizzazione isoelettrica, e simili (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, a cura di Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow e David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), ma il
15 metodo non è limitato a questi.

Esempi di tale cromatografia includono la cromatografia di affinità, la cromatografia a scambio ionico, la cromatografia idrofobica, la cromatografia a permeazione di gel, la cromatografia a fase inversa, e la cromatografia di adsorbimento.

Tale cromatografia può essere eseguita impiegando la cromatografia liquida quale HPLC o FPLC.

20 Come colonna da utilizzare nella cromatografia di affinità, possono essere esemplificate una colonna con la proteina A ed una colonna con la proteina G. Per esempio, come colonna che utilizza una colonna con la proteina A, possono essere esemplificate Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia) e simili.

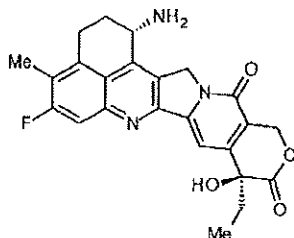
Inoltre, utilizzando un veicolante avente un antigene ivi immobilizzato, l'anticorpo può anche essere purificato utilizzando la proprietà di legame dell'anticorpo all'antigene.

[Composto antitumorale]

Viene spiegato il composto antitumorale da coniugare al coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione. Il composto antitumorale utilizzato nella presente invenzione non è particolarmente limitato se è un composto avente un effetto antitumorale ed un gruppo sostituito od una struttura parziale che permette la connessione ad una struttura di collegamento. Quando l'intero gruppo di collegamento od una sua parte vengono scissi nelle cellule tumorali, il gruppo funzionale del composto antitumorale viene rilasciato per mostrare l'effetto antitumorale del composto antitumorale. Come il gruppo di collegamento viene scisso ad una posizione di connessione al farmaco, il composto antitumorale viene rilasciato nella sua struttura non modificata per mostrare il suo effetto antitumorale intrinseco.

5
10
Come composto antitumorale utilizzato nella presente invenzione, può essere preferibilmente utilizzato l'exatecano ((1S,9S)-1-ammino-9-etil-5-fluoro-2,3-diidro-9-idrossi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-10,13 (9H,15H)-dione; mostrato nella seguente formula), uno dei derivati della camptotecina.

[Formula 14]



15
Sebbene avente un effetto antitumorale eccellente, l'exatecano non è stato commercializzato come farmaco antitumorale. Il composto può essere facilmente ottenuto mediante un metodo noto ed il gruppo amminico in posizione 1 può essere preferibilmente utilizzato come posizione di connessione alla struttura di collegamento. Inoltre, sebbene l'exatecano possa anche essere rilasciato nelle cellule tumorali mentre parte del gruppo di collegamento vi è ancora attaccata, è un composto eccellente che mostra un effetto antitumorale eccellente perfino in tale struttura.

Poiché l'exatecano ha una struttura della camptotecina, è noto che l'equilibrio si sposta verso una struttura con



un anello lattonico chiuso (anello chiuso) in un mezzo acido acquoso (per esempio pH 3 circa) ma si sposta verso una struttura con un anello lattonico aperto (anello aperto) in un mezzo basico acquoso (per esempio pH 10 circa). Si attende anche che un coniugato del farmaco che viene introdotto con un residuo di exatecano corrispondente alla struttura ad anello chiuso ed alla struttura ad anello aperto abbia lo stesso effetto antitumorale ed è inutile dire che qualsiasi di questi stati è nell'ambito della presente invenzione.

Altri esempi del composto antitumorale possono includere doxorubicina, daunorubicina, mitomicina C, bleomicina, ciclocitidina, vincristina, vinblastina, metotrexato, un agente antitumorale a base di platino (cisplatino o suoi derivati), taxolo o suoi derivati, e camptotecina o suoi derivati (agente antitumorale descritto nel brevetto giapponese aperto al pubblico No. 6-87746).

In relazione al coniugato anticorpo-farmaco, il numero di molecole di farmaco coniugate per molecola anticorpale è un fattore chiave avente un'influenza sull'efficacia e sulla sicurezza. La produzione del coniugato anticorpo-farmaco viene eseguita definendo la condizione di reazione comprese le quantità d'uso delle materie prime e dei reagenti per la reazione in modo tale da avere un costante numero di molecole di farmaco coniugate, ed il coniugato anticorpo-farmaco è in generale ottenuto come miscela contenente numeri differenti di molecole di farmaco coniugate, diversamente dalla reazione chimica di un composto a basso peso molecolare. Il numero di farmaci coniugati in una molecola anticorpale viene espresso o specificato mediante il valore medio, cioè, il numero medio di molecole di farmaco coniugate. Se non descritto specificamente altrimenti come principio, il numero di molecole di farmaco coniugate significa un valore medio eccetto nel caso in cui esso rappresenti un coniugato anticorpo-farmaco avente un numero specifico di molecole di farmaco coniugate che è incluso in una miscela di coniugato anticorpo-farmaco avente un numero differente di molecole di farmaco coniugate. Il numero di molecole di exatecano coniugate ad una molecola anticorpale è controllabile, e come numero medio di molecole di farmaco coniugate per anticorpo, possono essere connessi circa da 1 a 10 exatecani. Preferibilmente, è da 2 ad 8, e più preferibilmente da 3 ad 8. Nello stesso tempo, una persona esperta nell'arte può progettare una reazione per coniugare un numero richiesto di molecole di farmaco ad una molecola anticorpale in base alla descrizione degli esempi della presente domanda e può ottenere un coniugato anticorpo-farmaco con un numero controllato di molecole di exatecano.

[Struttura di collegamento]

In relazione al coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione, viene spiegata la struttura di collegamento per coniugare un composto antitumorale all'anticorpo anti-TROP2. Il gruppo di collegamento ha una struttura della formula seguente:



L'anticorpo è connesso al terminale di L^1 (terminale opposto alla connessione ad L^2), ed il composto antitumorale è connesso al gruppo carbonile del gruppo funzionale $-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$.

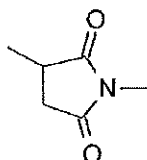
n^1 rappresenta un numero intero da 0 a 6 ed è preferibilmente un numero intero da 1 a 5, e più preferibilmente da 1 a 3.

10 1. L^1

L^1 è rappresentato dalla struttura di $-(succinimid-3-il-N)-(CH_2)n^3-C(O)-$.

Nel sopracitato, n^3 è un numero intero da 2 ad 8, e “-(succinimid-3-il-N)-” ha una struttura rappresentata dalla seguente formula:

[Formula 15]

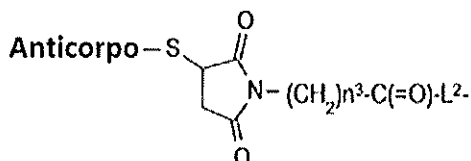


15

La posizione 3 della struttura parziale di cui sopra è una posizione di connessione all'anticorpo anti-TROP2. Il legame all'anticorpo anti-TROP2 in posizione 3 è caratterizzato dal legame con una formazione di tioetere. L'atomo di azoto in posizione 1 del gruppo funzionale strutturale è connesso all'atomo di carbonio del metilene che è presente all'interno del gruppo di collegamento comprendente la struttura. Specificamente, $-(succinimid-3-il-N)-(CH_2)n^3-C(=O)-$

20 L^2- è una struttura rappresentata dalla seguente formula (qui, “anticorpo-S-“ ha origine da un anticorpo).

[Formula 16]



Nella formula, n³ è un numero intero da 2 ad 8, e preferibilmente da 2 a 5.

Esempi specifici di L¹ possono includere

- 5 (succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-,
 (succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂-C(O)-,
 (succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
 (succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

2. L²

L² è un gruppo di collegamento rappresentato dalla struttura seguente:

- 10 -NH-(CH₂CH₂-O)^{n⁴}-CH₂CH₂-C(=O)-,

L² può non essere presente, ed in tal caso, L² è un legame singolo. Nel sopracitato, n⁴ è un numero intero da 1 a 6, e preferibilmente da 2 a 4. L² è connesso ad L¹ al suo gruppo ammino terminale ed è connesso ad L^p al suo gruppo carbonile all'altro terminale.

Esempi specifici di L² possono includere

- 15 -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-,
 -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-,
 -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-,
 -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-,
 -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-,
 20 -NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-.

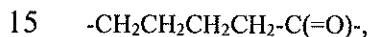
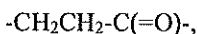
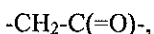
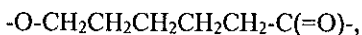
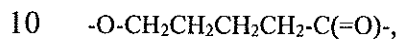
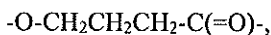
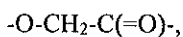
3. L^P

L^P è un residuo tetrapeptidico di -GGFG-(in cui G=glycina (Gly); F=fenilalanina (Phe)).

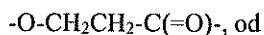
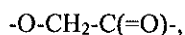
4. L^a-(CH₂)^{n²}-C(=O)-

5 L^a in L^a-(CH₂)^{n²}-C(=O)- è una struttura di -O- od un legame singolo. n² è un numero intero da 0 a 5, più preferibilmente da 0 a 3, più preferibilmente 0 od 1.

Esempi di L^a-(CH₂)^{n²}-C(=O)- possono includere quelli aventi le seguenti strutture:

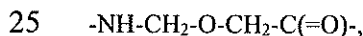
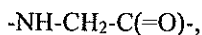


Di essi, si preferiscono



20 un caso in cui L^a è un legame singolo, ed n² è 0.

Esempi specifici della struttura rappresentata da -NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-(CH₂)^{n²}-C(=O)- nel gruppo di collegamento possono includere



$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,
 5 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$.
 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$, od
 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$
 sono più preferiti.

10 Nel gruppo di collegamento, la lunghezza di catena di $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n^1-\text{L}^a-(\text{CH}_2)_n^2-\text{C}(=\text{O})-$ è preferibilmente una lunghezza di catena da 4 a 7 atomi, e più preferibilmente una lunghezza di catena di 5 o di 6 atomi.

In relazione al coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione, si considera che quando il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco viene trasferito all'interno delle cellule tumorali, il gruppo funzionale di collegamento viene scisso ed il derivato del farmaco avente una struttura rappresentata da $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n^1-\text{L}^a-(\text{CH}_2)_n^2-$
 15 $\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ viene rilasciato per esprimere un'azione antitumorale. Esempi del derivato antitumorale che mostra un effetto antitumorale mediante il rilascio dal coniugato anticorpo-farmaco della presente invenzione comprendono un derivato antitumorale avente un gruppo funzionale strutturale in cui la struttura rappresentata da $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n^1-\text{L}^a-$
 $(\text{CH}_2)_n^2-\text{C}(=\text{O})-$ del gruppo di collegamento ha un gruppo ammino terminale, ed i particolarmente preferiti includono i
 seguenti.

20 $\text{NH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
 $\text{NH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
 $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
 $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$.

25 Nello stesso tempo, in caso di $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$, è stato confermato che, poiché la struttura amminale nella molecola è instabile, essa subisce ancora un'autodegradazione per rilasciare il seguente $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

(NH-DX). Questi composti possono essere anche preferibilmente utilizzati come intermedio di produzione del coniugato anticorpo-farmaco della presente invenzione.

Per il coniugato anticorpo-farmaco della presente invenzione in cui l'exatecano viene utilizzato come farmaco, si preferisce che il gruppo funzionale strutturale di collegamento del farmaco $[-L^1-L^2-L^p-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$
 5 $(NH-DX)]$ avente la seguente struttura sia connesso ad un anticorpo. Il numero medio di coniugati del suddetto gruppo funzionale strutturale di collegamento del farmaco per anticorpo può essere da 1 a 10. Preferibilmente, è da 2 ad 8, e più preferibilmente da 3 ad 8.

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

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

10 (succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

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

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

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

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

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

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

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

Tra essi, i più preferiti sono i seguenti.

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

25 (succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

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

I particolarmente preferiti sono i seguenti.

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

In relazione alla struttura di collegamento per coniugare l'anticorpo anti-TROP2 ed un farmaco nel coniugato anticorpo-farmaco della presente invenzione, il gruppo di collegamento preferito può essere costruito connettendo le strutture preferite mostrate per ciascuna parte del gruppo di collegamento spiegate sopra. Per quanto riguarda la struttura di collegamento, possono essere preferibilmente utilizzate quelle con la seguente struttura. Nello stesso tempo, il terminale sinistro della struttura è una posizione di connessione con l'anticorpo ed il terminale destro è una posizione di connessione con il farmaco.

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

(succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(O)-,
(succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂-C(=O)-,
(succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
5 CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

Tra essi, i più preferiti sono i seguenti.

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

I particolarmente preferiti includono i seguenti.

15 (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
(succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
(succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(O)-.
[Metodo di produzione]

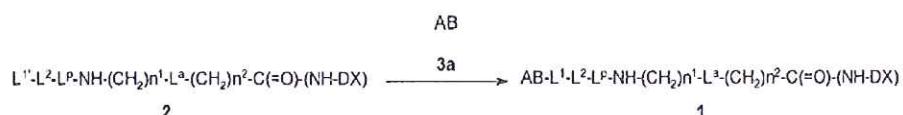
20 Poi, vengono fornite spiegazioni per il metodo rappresentativo per produrre il coniugato anticorpo-farmaco della presente invenzione od un suo intermedio di produzione. Nello stesso tempo, i composti vengono descritti qui sotto con il numero di composto mostrato in ciascuna formula di reazione. Specificamente, essi vengono indicati come “composto di formula (1)”, un “composto (1)”, o simili. I composti con numeri diversi da quelli vengono anch’essi descritti in modo simile.

1. Metodo di produzione 1

25 Il coniugato anticorpo-farmaco rappresentato dalla formula (1) che è connesso alla struttura di collegamento del

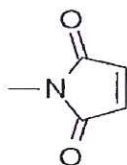
farmaco attraverso un tioetere può essere prodotto mediante il seguente metodo, per esempio

[Formula 17]



[Nella formula, AB rappresenta un anticorpo avente un gruppo sulfidrilico, ed L¹ rappresenta la struttura di collegamento L¹ in cui il terminale di collegamento è un gruppo maleimmidile (formula mostrata sotto)

[Formula 18]

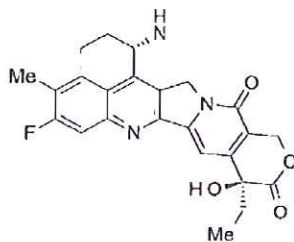


5

(nella formula, l'atomo di azoto è la posizione di connessione),

e rappresenta specificamente un gruppo in cui il gruppo funzionale -(succinimid-3-il-N)- in -(succinimid-3-il-N)-(CH₂)ⁿ-C(=O)- di L¹ è un gruppo maleimmidile. Inoltre, l'-(NH-DX) rappresenta una struttura rappresentata dalla seguente formula:

[Formula 19]



10

e rappresenta un gruppo che è derivato rimuovendo un atomo di idrogeno del gruppo ammino in posizione 1 dell'exatecano.]



Inoltre, il composto di formula (1) nella formula di reazione di cui sopra è interpretato come struttura in cui un gruppo funzionale strutturale corrispondente dal farmaco al terminale di collegamento si collega ad un anticorpo. Tuttavia, è solo la descrizione data per convenienza, e vi sono effettivamente molti casi in cui una pluralità dei gruppi funzionali strutturali è connessa ad una molecola anticorpale. Lo stesso si applica alla spiegazione del metodo di produzione descritto sotto.

Il coniugato anticorpo-farmaco (1) può essere preparato facendo reagire il composto (2), il quale può essere ottenuto mediante il metodo descritto sotto, con l'anticorpo (3a) avente un gruppo sulfidrilico.

L'anticorpo (3a) avente un gruppo sulfidrilico può essere ottenuto mediante un metodo ben noto nell'arte (Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, pagine da 56 a 136, pagine da 456 a 493, Academic Press (1996)). Esempi includono: il reagente di Traut viene fatto reagire con il gruppo amminico dell'anticorpo; gli N-succinimidil S-acetiltoalcanoati vengono fatti reagire con il gruppo amminico dell'anticorpo cui segue la reazione con idrossilammina; dopo aver reagito con N-succinimidil 3-(piridilditio)propionato, l'anticorpo viene fatto reagire con un agente riducente; l'anticorpo viene fatto reagire con un agente riducente quale ditiotreitolo, 2-mercaptoetanololo, e tris(2-carbossietil)fosfina cloridrato (TCEP) per ridurre il legame disolfuro in una parte cerniera nell'anticorpo per formare un gruppo sulfidrilico, ma non sono limitati a questi.

Specificamente, utilizzando da 0,3 a 3 equivalenti molarli di TCEP come agente riducente per il disolfuro nella parte cerniera nell'anticorpo e facendolo reagire con l'anticorpo in una soluzione tampone contenente un agente chelante, può essere ottenuto l'anticorpo con un disolfuro parzialmente o completamente ridotto nella parte cerniera nell'anticorpo. Esempi dell'agente chelante includono acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) ed acido dietilentriamminopentaacetico (DTPA). Può essere utilizzato ad una concentrazione da 1mM a 20mM. Esempi della soluzione tampone che può essere utilizzata includono una soluzione di fosfato di sodio, di borato di sodio, o di acetato di sodio. Specificamente, facendo reagire l'anticorpo con TCEP ad una temperatura da 4°C a 37°C per da 1 a 4 ore, può essere ottenuto l'anticorpo (3a) avente un gruppo sulfidrilico parzialmente o completamente ridotto.

Nello stesso tempo, conducendo la reazione per aggiungere un gruppo sulfidrilico ad un gruppo funzionale di collegamento del farmaco, il gruppo funzionale di collegamento del farmaco può essere coniugato mediante un legame

tioetere.

Utilizzando da 2 a 20 equivalenti molarli del composto (2) per l'anticorpo (3a) avente un gruppo sulfidrilico, può essere prodotto il coniugato anticorpo-farmaco (1) in cui sono coniugate da 2 ad 8 molecole di farmaco per anticorpo. Specificamente, è sufficiente che la soluzione contenente il composto (2) ivi disciolto venga aggiunta ad una soluzione tampone contenente l'anticorpo (3a) avente un gruppo sulfidrilico per la reazione. Qui, esempi della soluzione tampone che può essere utilizzata includono una soluzione di acetato di sodio, di fosfato di sodio, e di borato di sodio. Il pH per la reazione è da 5 a 9, e più preferibilmente la reazione viene condotta vicino a pH 7. Esempi del solvente per sciogliere il composto (2) includono un solvente organico quale dimetilsolfossido (DMSO), dimetilformammide (DMF), dimetilacetammide (DMA), ed N-metil-2-piridone (NMP).

È sufficiente che la soluzione in solvente organico contenente il composto (2) ivi disciolto venga aggiunta dall'1% al 20% v/v ad una soluzione tampone contenente l'anticorpo (3a) avente un gruppo sulfidrilico per la reazione. La temperatura di reazione è da 0°C a 37°C, più preferibilmente da 10°C a 25°C, ed il tempo di reazione è da 0,5 a 2 ore. La reazione può essere terminata deattivando la reattività del composto non reagito (2) con un reagente contenente tiolo. Esempi del reagente contenente tiolo includono cisteina ed N-acetil-L-cisteina (NAC). Più specificamente, da 1 a 2 equivalenti molarli di NAC vengono aggiunti al composto (2) utilizzato e, incubando a temperatura ambiente per da 10 a 30 minuti, la reazione può essere terminata.

Il coniugato anticorpo-farmaco prodotto (1) può essere sottoposto, dopo la concentrazione, allo scambio del tampone, alla purificazione, ed alla misurazione della concentrazione di anticorpo e del numero medio di molecole di farmaco coniugate per molecola anticorpale secondo comuni procedure descritte sotto, all'identificazione del coniugato anticorpo-farmaco (1).

Procedura comune A: concentrazione della soluzione acquosa di anticorpo o di coniugato anticorpo-farmaco

Ad un contenitore Amicon Ultra (50.000 limite di peso molecolare, Millipore Corporation), è stata aggiunta una soluzione di anticorpo o di coniugato anticorpo-farmaco e la soluzione dell'anticorpo o del coniugato anticorpo-farmaco è stata concentrata mediante centrifugazione (centrifuga per da 5 a 20 minuti da 2000 G a 3800 G) utilizzando una centrifuga (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.).

Procedura comune B: misurazione della concentrazione di anticorpo

Utilizzando un rilevatore UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), la misurazione della concentrazione di anticorpo è stata eseguita secondo il metodo definito dal produttore. A quel tempo, è stato utilizzato un coefficiente di assorbimento a 280 nm differente per ciascun anticorpo (da 1,3 mlmg⁻¹cm⁻¹ ad 1,8 mlmg⁻¹cm⁻¹).

5 Procedura comune C-1: scambio del tampone per anticorpo

Una colonna NAP-25 (numero di catalogo 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) che utilizza un veicolante Sephadex G-25 è stata equilibrata con tampone fosfato (10mM, pH 6,0; viene indicato come PBS6,0/EDTA nella descrizione) contenente cloruro di sodio (137mM) ed acido etilendiamminotetraacetico (EDTA, 5mM) secondo il metodo definito dal produttore. La soluzione acquosa dell'anticorpo è stata applicata in una quantità di 2,5 ml ad una
10 singola colonna NAP-25, e quindi la frazione (3,5 ml) eluita con 3,5 ml di PBS6,0/EDTA è stata raccolta. La frazione risultante è stata concentrata mediante la procedura comune A. Dopo la misurazione della concentrazione dell'anticorpo utilizzando la procedura comune B, la concentrazione dell'anticorpo è stata regolata a 10 mg/ml utilizzando PBS6,0/EDTA.

Procedura comune C-2: scambio del tampone per anticorpo

15 Una colonna NAP-25 (numero di catalogo 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) che utilizza un veicolante Sephadex G-25 è stata equilibrata con tampone fosfato (50mM, pH 6,5; viene indicato come PBS6,5/EDTA nella descrizione) contenente cloruro di sodio (50mM) ed EDTA (2mM) secondo il metodo definito dal produttore. La soluzione acquosa dell'anticorpo è stata applicata in una quantità di 2,5 ml ad una singola colonna NAP-25, e quindi la frazione (3,5 ml) eluita con 3,5 ml di PBS6,5/EDTA è stata raccolta. La frazione risultante è stata concentrata mediante
20 la procedura comune A. Dopo la misurazione della concentrazione dell'anticorpo utilizzando la procedura comune B, la concentrazione dell'anticorpo è stata regolata a 20 mg/ml utilizzando PBS6,5/EDTA.

Procedura comune D: purificazione del coniugato anticorpo-farmaco

25 Una colonna NAP-25 è stata equilibrata con qualsiasi tampone scelto tra tampone fosfato (PBS7,4, numero di catalogo 10010-023, Invitrogen), tampone fosfato di sodio (10mM, pH 6,0; viene indicato come PBS6,0) contenente cloruro di sodio (137mM), e tampone acetato contenente sorbitolo (5%) (10mM, pH 5,5; viene indicato come ABS nella

descrizione) disponibile in commercio. La soluzione acquosa della reazione del coniugato anticorpo-farmaco è stata applicata in una quantità di circa 1,5 ml alla colonna NAP-25, e quindi eluita con il tampone in una quantità definita dal produttore per raccogliere la frazione anticorpale. La frazione raccolta è stata applicata ancora alla colonna NAP-25 e, ripetendo da 2 a 3 volte in totale il procedimento di purificazione della permeazione su gel per eluire con un tampone, è stato ottenuto il coniugato anticorpo-farmaco escludendo il gruppo di collegamento del farmaco non coniugato ed un composto a basso peso molecolare (tris(2-carbossietil)fosfina cloridrato (TCEP), N-acetil-L-cisteina (NAC), e dimetilsolfossido). Procedura comune E: misurazione della concentrazione di anticorpo nel coniugato anticorpo-farmaco e del numero medio di molecole di farmaco coniugate per molecola anticorpale (1).

La concentrazione di farmaco coniugato nel coniugato anticorpo-farmaco può essere calcolata misurando l'assorbanza UV di una soluzione acquosa del coniugato anticorpo-farmaco a due lunghezze d'onda di 280 nm e di 370 nm, cui segue l'esecuzione del calcolo mostrato sotto.

Poiché l'assorbanza totale a qualsiasi lunghezza d'onda è uguale alla somma dell'assorbanza di ogni specie chimica che assorbe luce che è presente in un sistema (additività dell'assorbanza), quando i coefficienti di assorbimento molare dell'anticorpo e del farmaco rimangono gli stessi prima e dopo la coniugazione tra l'anticorpo ed il farmaco, la concentrazione dell'anticorpo e la concentrazione del farmaco nel coniugato anticorpo-farmaco vengono espresse con le seguenti equazioni.

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

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

Nel sopracitato, A_{280} rappresenta l'assorbanza di una soluzione acquosa del coniugato anticorpo-farmaco a 280 nm, A_{370} rappresenta l'assorbanza di una soluzione acquosa del coniugato anticorpo-farmaco a 370 nm, $A_{A,280}$ rappresenta l'assorbanza di un anticorpo a 280 nm, $A_{A,370}$ rappresenta l'assorbanza di un anticorpo a 370 nm, $A_{D,280}$ rappresenta l'assorbanza di un precursore del coniugato a 280 nm, $A_{D,370}$ rappresenta l'assorbanza di un precursore del coniugato a 370 nm, $\epsilon_{A,280}$ rappresenta il coefficiente di assorbimento molare di un anticorpo a 280 nm, $\epsilon_{A,370}$ rappresenta il coefficiente

di assorbimento molare di un anticorpo a 370 nm, $\epsilon_{D,280}$ rappresenta il coefficiente di assorbimento molare di un precursore del coniugato a 280 nm, $\epsilon_{D,370}$ rappresenta il coefficiente di assorbimento molare di un precursore del coniugato a 370 nm, C_A rappresenta la concentrazione dell'anticorpo in un coniugato anticorpo-farmaco, e C_D rappresenta la concentrazione del farmaco in un coniugato anticorpo-farmaco.

5 Per quanto riguarda $\epsilon_{A,280}$, $\epsilon_{A,370}$, $\epsilon_{D,280}$, ed $\epsilon_{D,370}$ nel sopracitato, vengono utilizzati valori precedentemente preparati (valore stimato sulla base del calcolo o valore di misurazione ottenuto mediante misurazione UV del composto). Per esempio, $\epsilon_{A,280}$ può essere stimato dalla sequenza amminoacidica di un anticorpo utilizzando un metodo di calcolo noto (Protein Science, 1995, volume 4, da 2411 a 2423). $\epsilon_{A,370}$ è in generale zero. $\epsilon_{D,280}$ ed $\epsilon_{D,370}$ possono essere ottenuti
10 in base alla legge di Lambert-Beer (assorbanza=concentrazione molare×coefficiente di assorbimento molare×lunghezza del cammino cellulare) misurando l'assorbanza di una soluzione in cui il precursore del coniugato da utilizzare viene disciolto ad una certa concentrazione molare. Misurando A_{280} di una soluzione acquosa del coniugato anticorpo-farmaco e risolvendo le equazioni simultanee (I) e (II) utilizzando i valori, possono essere ottenute C_A e C_D . Inoltre, dividendo C_D per C_A , può essere ottenuto il numero medio di farmaco coniugato per anticorpo.

15 Procedura comune F: misurazione del numero medio di molecole di farmaco coniugate per molecola anticorpale nel coniugato anticorpo-farmaco (2).

Il numero medio di molecole di farmaco coniugate per molecola anticorpale nel coniugato anticorpo-farmaco può essere anche determinato mediante analisi di cromatografia liquida a prestazione elevata (HPLC) utilizzando un metodo descritto sotto, oltre alla procedura comune E menzionata sopra.

[F-1. Preparazione di un campione per l'analisi HPLC (riduzione del coniugato anticorpo-farmaco)]

20 Una soluzione di coniugato anticorpo-farmaco (circa 1 mg/ml, 60 μ l) viene miscelata con una soluzione acquosa di ditiotreitolo (DTT) (100mM, 15 μ l). La miscela viene incubata a 37°C per 30 minuti per scindere il legame disolfuro tra la catena L e la catena H del coniugato anticorpo-farmaco. Il campione risultante viene utilizzato in analisi HPLC.

[F-2. Analisi HPLC]

L'analisi HPLC viene condotta nelle seguenti condizioni di misurazione:

25 sistema HPLC: sistema HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies, Inc.)

rilevatore: spettrometro ad assorbimento UV (lunghezza d'onda di misurazione: 280 nm)

colonna: PLRP-S (2,1 mm × 50 mm, 8 μm, 1000 angstrom; Agilent Technologies, Inc., P/N PL1912-1802)

temperatura della colonna: 80°C

fase mobile A: soluzione di acido trifluoroacetico acquoso (TFA) allo 0,04%

5 fase mobile B: soluzione di acetonitrile contenente TFA allo 0,04%

programma di gradiente: dal 29% al 36% (da 0 minuti a 12,5 minuti), dal 36% al 42% (da 12,5 minuti a 15 minuti), dal 42% al 29% (da 15 minuti a 15,1 minuti), dal 29% al 29% (da 15,1 minuti a 25 minuti)

volume di iniezione del campione: 15 μl

[F-3. Analisi dei dati]

10 [F-3-1] In confronto ad una catena L (L_0) e ad una catena H (H_0) di un anticorpo non coniugato, una catena L coniugata al farmaco (catena L connessa ad una molecola del farmaco: L_1) e catene H coniugate al farmaco (catena H connessa ad una molecola del farmaco: H_1 , catena H connessa a due molecole del farmaco: H_2 , catena H connessa a tre molecole del farmaco: H_3) mostrano idrofobicità superiore in proporzione al numero di molecole di farmaco coniugate e così hanno un tempo di ritenzione superiore. Queste catene sono quindi eluite nell'ordine di L_0 ed L_1 od H_0 , H_1 , H_2 , ed H_3 . I picchi di

15 rilevamento possono essere assegnati a qualsiasi di L_0 , L_1 , H_0 , H_1 , H_2 , ed H_3 mediante il confronto dei tempi di ritenzione con L_0 ed H_0 .

[F-3-2] Poiché il gruppo di collegamento del farmaco ha un assorbimento UV, i valori dell'area del picco sono corretti in risposta al numero di molecole coniugate del gruppo di collegamento del farmaco secondo la seguente espressione che utilizza i coefficienti di assorbimento molare della catena L, della catena H, e del gruppo di collegamento del farmaco.

[Espressione 1]

Valore corretto dell'area del picco della catena L (L_i)

= Area del picco

$$\times \frac{\text{coefficiente di estinzione molare della catena L}}{\text{coefficiente di estinzione molare della catena L + il numero di molecole di farmaco coniugate} \times \text{coefficiente di estinzione molare del gruppo di collegamento del farmaco}}$$

[Espressione 2]

Valore corretto dell'area del picco della catena H (H_i)

= Area del picco

$$\times \frac{\text{coefficiente di estinzione molare della catena H}}{\text{coefficiente di estinzione molare della catena H + il numero di molecole di farmaco coniugate} \times \text{coefficiente di estinzione molare del gruppo di collegamento del farmaco}}$$

Qui, come per il coefficiente di estinzione molare (280 nm) della catena L o della catena H di ciascun anticorpo, può essere utilizzato un valore stimato dalla sequenza amminoacidica della catena L o della catena H di ciascun anticorpo mediante un metodo di calcolo noto (Protein Science, 1995, volume 4, da 2411 a 2423). Nel caso di hTINA, un
 5 coefficiente di estinzione molare di 34.690 ed un coefficiente di estinzione molare di 95.000 sono stati utilizzati come valori stimati per la catena L e per la catena H, rispettivamente, secondo la loro sequenza amminoacidica. Per quanto riguarda il coefficiente di estinzione molare (280 nm) del gruppo di collegamento del farmaco, è stato utilizzato il
 10 coefficiente di estinzione molare misurato (280 nm) di un composto in cui il gruppo maleimmide è stato convertito in succinimmide tioetere mediante la reazione di ciascun gruppo di collegamento del farmaco con mercaptoetanolo o con N-acetilcisteina.

[F-3-3] Il rapporto dell'area del picco (%) di ciascuna catena è calcolato per il totale dei valori corretti delle aree del picco

secondo la seguente espressione.

[Espressione 3]

$$\text{Rapporto dell'area del picco della catena L} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

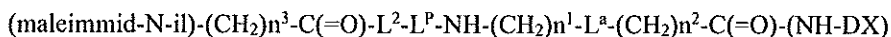
$$\text{Rapporto dell'area del picco della catena H} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

A_{Li} , A_{Hi} : valori corretti delle rispettive aree del picco di L_i e di H_i

5 [F-3-4] Il numero medio di molecole di farmaco coniugate per molecola anticorpale nel coniugato anticorpo-farmaco è calcolato secondo la seguente espressione.

Numero medio di molecole di farmaco coniugate=(rapporto dell'area del picco di $L_0 \times 0 +$ rapporto dell'area del picco di $L_0 \times 1 +$ rapporto dell'area del picco di $H_0 \times 0 +$ rapporto dell'area del picco di $H_1 \times 1 +$ rapporto dell'area del picco di $H_2 \times 2 +$ rapporto dell'area del picco di $H_3 \times 3)/100 \times 2$.

10 Il composto rappresentato dalla formula (2) nel metodo di produzione 1 è un composto rappresentato dalla seguente formula:



Nella formula,

n^3 rappresenta un numero intero da 2 ad 8,

L^2 rappresenta -NH-(CH₂CH₂-O)^{n⁴}-CH₂CH₂-C(=O)- od un legame singolo,

15 in cui n^4 rappresenta un numero intero da 1 a 6,

L^p rappresenta un residuo tetrapeptidico di -GGFG-

n^1 rappresenta un numero intero da 0 a 6,

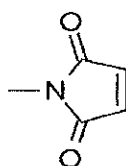
n^2 rappresenta un numero intero da 0 a 5,

L^a rappresenta -O- od un legame singolo,

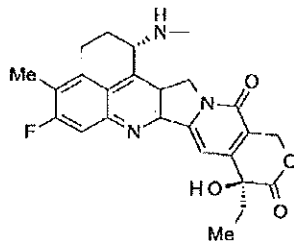
20 (maleimmid-N-il)- è un gruppo maleimmidile (gruppo 2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-ile) rappresentato dalla seguente

formula:

[Formula 20]



in cui l'atomo di azoto è una posizione di connessione, $-(NH-DX)$ è un gruppo rappresentato dalla seguente formula:
[Formula 21]



5

in cui l'atomo di azoto del gruppo ammino in posizione 1 è una posizione di connessione.

Quando L^2 è un legame singolo od $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$, si preferisce come intermedio di produzione un composto in cui n^4 è un numero intero da 2 a 4.

10 Inoltre, come per $1-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$, si preferisce come intermedio di produzione un composto avente $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, od $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$. È più preferito un composto avente $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, od $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$.

15 Inoltre, nel composto rappresentato dalla formula (2), si preferisce come intermedio di produzione un composto in cui n^3 è un numero intero da 2 a 5, L^2 è un legame singolo, ed $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$ è $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, od $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$. È più preferito un composto in cui $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$ è $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, od $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$. È ulteriormente preferito un composto in cui n^3 è un numero intero pari a 2 oppure a 5.

Inoltre, nel composto rappresentato dalla formula (2), si preferisce come intermedio di produzione un composto in cui n^3 è un numero intero da 2 a 5, L^2 è $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})^{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$, n^4 è un numero intero da 2 a 4, ed $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-$ è $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$, od $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$. È più preferito un composto in cui n^4 è un numero intero pari a 2 oppure a 4. È
 5 ulteriormente preferito un composto in cui $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-$ è $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$, od $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$.

Come tali intermedi preferiti utili nella produzione del composto della presente invenzione, possono essere esemplificati i seguenti.

- (Maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- 10 (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- 15 (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- 20 (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,
- 25 (maleimmid-N-il)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$,

- (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 5 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 10 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

15 Il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione può essere preparato facendo reagire un composto di collegamento del farmaco scelto dal gruppo descritto sopra di composti degli intermedi di produzione con un anticorpo anti-TROP2 o con un suo derivato reattivo e formando un legame tioetere ad un sito di legame disolfuro presente in una parte cerniera dell'anticorpo anti-TROP2. In questo caso, viene preferibilmente utilizzato un derivato reattivo dell'anticorpo anti-TROP2. In particolare, si preferisce un derivato reattivo ottenuto riducendo l'anticorpo anti-TROP2.

20 I seguenti sono composti più preferiti come intermedi di produzione.

- (Maleimmid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 25 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimmid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
(maleimmid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
(maleimmid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
5 (maleimmid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
(maleimmid-N-il)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Tra il gruppo descritto sopra di composti intermedi, un composto rappresentato dalla seguente formula:

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

(maleimmid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), o
(maleimmid-N-il)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
è un ulteriore composto preferito.

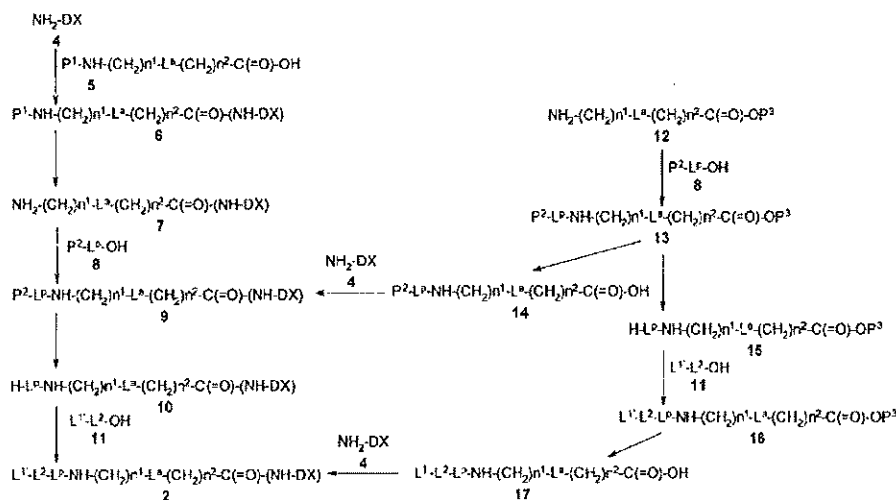
15 Allo scopo di assicurare la quantità del coniugato, una pluralità di coniugati ottenuti in condizioni di produzione simili per avere un numero equivalente di farmaci (per esempio circa ±1) può essere miscelata per preparare nuovi lotti. In questo caso, il numero medio di farmaci ricade tra i numeri medi di farmaci nei coniugati prima della miscelazione.

2. Metodo di produzione 2

Il composto rappresentato dalla formula (2) come intermedio utilizzato nel precedente metodo di produzione ed un suo sale farmacologicamente accettabile possono essere prodotti mediante il seguente metodo, per esempio

20

[Formula 22]



Nella formula, L^1 rappresenta un gruppo maleimmidile, e P^1 , P^2 , e P^3 rappresentano ciascuno un gruppo protettivo.

5 Il composto (6) può essere prodotto derivatizzando l'acido carbossilico (5) in un estere attivo, in un'anidride mista dell'acido, in un alogenuro dell'acido, o simili e facendolo reagire con NH_2-DX (4) o con un suo sale farmacologicamente accettabile in presenza di una base. NH_2-DX (4) rappresenta l'exatecano (nome chimico: (1S,9S)-1-ammino-9-etil-5-fluoro-2,3-diidro-9-idrossi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-10,13 (9H,15H)-dione).

10 I reagenti e le condizioni di reazione che vengono comunemente utilizzati per la sintesi peptidica possono essere impiegati per la reazione. Vi sono vari tipi di estere attivo. Per esempio, esso può essere preparato facendo reagire fenoli quali p-nitrofenolo, N-idrossibenzotriazolo, N-idrossisuccinimide, o simili, con l'acido carbossilico (5) utilizzando un agente di condensazione quale N,N'-dicicloesilcarbodiimide od 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide cloridrato. Inoltre, l'estere attivo può anche essere prodotto da una reazione dell'acido carbossilico (5) con
 15 pentafluorofeniltrifluoroacetato o simili; da una reazione dell'acido carbossilico (5) con 1-

benzotriazolilossitripirrolidinofosfonio esafluorofosfite; da una reazione dell'acido carbossilico (5) con dietilcianofosfonato (metodo di salatura); da una reazione dell'acido carbossilico (5) con trifenilfosfina e con 2,2'-dipiridildisolfuro (metodo di Mukaiyama); da una reazione dell'acido carbossilico (5) con un derivato della triazina quale cloruro di 4-(4,6-dimetossi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM); o simili. Inoltre, la reazione può anche essere eseguita, per esempio, da un metodo dell'alogenuro dell'acido mediante il quale l'acido carbossilico (5) viene trattato con un alogenuro dell'acido quale cloruro di tionile e cloruro di ossalile in presenza di una base.

Facendo reagire l'estere attivo, l'anidride mista dell'acido, o l'alogenuro dell'acido dell'acido carbossilico (5) ottenuti come sopra con il composto (4) in presenza di una base adatta in un solvente inerte ad una temperatura di reazione da -78°C a 150°C, può essere prodotto il composto (6). Nello stesso tempo, "solvente inerte" indica un solvente che non inibisce una reazione bersaglio per la quale viene utilizzato il solvente.

Esempi specifici della base utilizzata per ciascun passaggio descritto sopra possono includere carbonato, alcossido, idrossido, od idruo di un metallo alcalino o di un metallo alcalino terroso compresi carbonato di sodio, carbonato di potassio, etossido di sodio, butossido di potassio, idrossido di sodio, idrossido di potassio, idruo di sodio, ed idruo di potassio, una base organometallica rappresentata da un alchillitio compresi n-butillitio, dialchilammino litio compresa diisopropilammide di litio; una base organometallica di bissililammina compresa bis(trimetilsilil)ammide di litio; ed una base organica compresi un'ammina terziaria od un composto eterociclico contenente azoto quali piridina, 2,6-lutidina, collidina, 4-dimetilamminopiridina, trietilammina, N-metilmorfolina, diisopropilettilammina, e diazabicciclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU).

Esempi del solvente inerte che viene utilizzato per la reazione della presente invenzione comprendono un solvente idrocarburico alogenato quale diclorometano, cloroformio, e tetracloruro di carbonio; un solvente etero quale tetraidrofurano, 1,2-dimetossietano, e diossano; un solvente idrocarburico aromatico quale benzene e toluene; ed un solvente ammidico, quale N,N-dimetilformammide, N,N-dimetilacetammide, ed N-metilpirrolidin-2-one. Oltre ad essi, possono essere utilizzati in qualche caso un solvente solfossidico quale dimetilsolfossido e solfolano; un solvente chetonico, quale acetone e metiletilchetone; ed un solvente alcolico quale metanolo ed etanolo. Inoltre, questi solventi possono essere miscelati per l'uso.

Per quanto riguarda il gruppo protettivo P¹ per il gruppo ammino terminale del composto (6), può essere utilizzato un gruppo protettivo per un gruppo ammino che viene generalmente utilizzato per la sintesi peptidica, per esempio, un gruppo tert-butilossicarbonile, un gruppo 9-fluorenilmetilossicarbonile, ed un gruppo benzilossicarbonile. Esempi dell'altro gruppo protettivo per un gruppo ammino possono includere un gruppo alcanoile quale un gruppo acetile; un gruppo alcossicarbonile quale un gruppo metossicarbonile ed un gruppo etossicarbonile; un gruppo arilmetossicarbonile quale un gruppo parametossibenilossicarbonile, ed un gruppo para(od orto)nitrobenilossicarbonile; un gruppo arilmetile quale un gruppo benzile ed un gruppo trifenilmetile; un gruppo aroile quale un gruppo benzoile; ed un gruppo arilsolfonile quale un gruppo 2,4-dinitrobenzensolfonile ed un gruppo ortonitrobenzensolfonile. Il gruppo protettivo P¹ può essere scelto, per esempio, in relazione alle proprietà di un composto avente un gruppo ammino da proteggere.

Deproteggendo il gruppo protettivo P¹ per il gruppo ammino terminale del composto (6) ottenuto, può essere prodotto il composto (7). Per questa deprotezione, i reagenti e le condizioni possono essere scelti in relazione al gruppo protettivo.

Il composto (9) può essere prodotto derivatizzando l'acido carbossilico del peptide (8) avente l'amminoterminale protetto con P² in un estere attivo, in un'anidride mista dell'acido, o simili e facendolo reagire con il composto (7) ottenuto. Le condizioni di reazione, i reagenti, la base, ed il solvente inerte utilizzati per formare un legame peptidico tra l'acido carbossilico del peptide (8) ed il composto (7) possono essere opportunamente scelti ed utilizzati da quelli descritti per la sintesi del composto (6). Il gruppo protettivo P² può essere opportunamente scelto ed utilizzato da quelli descritti per il gruppo protettivo del composto (6) e la selezione può essere fatta, per esempio, sulla base delle proprietà del composto avente un gruppo ammino da proteggere. Come si usa generalmente per la sintesi peptidica, ripetendo consecutivamente la reazione e la deprotezione dell'amminoacido o del peptide costituente l'acido carbossilico del peptide (8) per l'allungamento, può essere prodotto anche il composto (9).

Deproteggendo il gruppo protettivo P² per il gruppo ammino del composto (9) ottenuto, può essere prodotto il composto (10). Per questa deprotezione, i reagenti e le condizioni possono essere scelti in relazione al gruppo protettivo.

È possibile produrre il composto (2) derivatizzando l'acido carbossilico (11) in un estere attivo, in un'anidride

mista dell'acido, in un alogenuro dell'acido, o simili e facendolo reagire con il composto (10) ottenuto. Le condizioni di reazione, i reagenti, la base, ed il solvente inerte utilizzati per formare un legame peptidico tra l'acido carbossilico (11) ed il composto (10) possono essere opportunamente scelti ed utilizzati da quelli descritti per la sintesi del composto (6).

Il composto (9) può anch'esso essere prodotto mediante il seguente metodo, per esempio.

5 Il composto (13) può essere prodotto derivatizzando l'acido carbossilico del peptide (8) avente l'amminoterminale protetto con P^2 in un estere attivo, in un'anidride mista dell'acido, o simili e facendolo reagire in presenza di una base con il composto amminico (12) avente il gruppo carbossile protetto con P^3 . Le condizioni di reazione, i reagenti, la base, ed il solvente inerte utilizzati per formare un legame peptidico tra l'acido carbossilico del peptide (8) ed il composto (12) possono essere opportunamente scelti ed utilizzati da quelli descritti per la sintesi del composto (6).

10 Il gruppo protettivo P^2 per il gruppo ammino del composto (13) può essere protetto con un gruppo protettivo che viene comunemente utilizzato.

Specificamente, esempi del gruppo protettivo per un gruppo idrossile includono un gruppo alcossimetile quale un gruppo metossimetile; un gruppo arilmetile quale un gruppo benzile, un gruppo 4-metossibenzile, ed un gruppo trifenilmetile; un gruppo alcanoile quale un gruppo acetile; un gruppo aroile quale un gruppo benzoile; ed un gruppo silile
15 quale un gruppo tert-butildifenilsilile. Un gruppo carbossile può essere protetto, per esempio, come un estere con un gruppo alchile quale un gruppo metile, un gruppo etile, ed un gruppo tert-butile, un gruppo allile, od un gruppo arilmetile quale un gruppo benzile. Esempi del gruppo protettivo per un gruppo ammino includono, per esempio, un gruppo alchilossicarbonile quale un gruppo tert-butilossicarbonile, un gruppo metossicarbonile, ed un gruppo etossicarbonile; un gruppo allilossicarbonile, od un gruppo arilmetossicarbonile quale un gruppo 9-fluorenilmetilossicarbonile, un gruppo
20 benzilossicarbonile, un gruppo parametossibenzilossicarbonile, ed un gruppo para(od orto)nitrobenzilossicarbonile; un gruppo alcanoile quale un gruppo acetile; un gruppo arilmetile quale un gruppo benzile ed un gruppo trifenilmetile; un gruppo aroile quale un gruppo benzoile; ed un gruppo arilsolfonile quale un gruppo 2,4-dinitrobenzensolfonile od un gruppo ortonitrobenzensolfonile.

25 Per quanto riguarda il gruppo protettivo P^3 per un gruppo carbossile, può essere utilizzato un gruppo protettivo comunemente utilizzato come gruppo protettivo per un gruppo carbossile nella chimica della sintesi organica, in

particolare, la sintesi peptidica. Esempi specifici includono esteri con un gruppo alchile quale un gruppo metile, un gruppo etile, od un tert-butile, esteri allilici, ed esteri benzilici, ed il gruppo protettivo può essere scelto opportunamente dai gruppi protettivi descritti sopra. In tal caso, si preferisce che il gruppo protettivo per un gruppo ammino ed il gruppo protettivo per un gruppo carbossile possano essere quelli preferibilmente rimossi mediante un metodo differente o differenti condizioni. Per esempio, un esempio rappresentativo comprende una combinazione in cui P^2 è un gruppo tert-butilossicarbonile e P^3 è un gruppo benzile. I gruppi protettivi possono essere scelti da quelli sopracitati in relazione, per esempio, alle proprietà di un composto avente un gruppo ammino ed un gruppo carbossile da proteggere. Per la rimozione dei gruppi protettivi, i reagenti e le condizioni possono essere scelti in relazione al gruppo protettivo.

Deproteggendo il gruppo protettivo P^3 per il gruppo carbossile del composto (13) ottenuto, può essere prodotto il composto (14). Per questa deprotezione, i reagenti e le condizioni vengono selezionati in relazione al gruppo protettivo.

Il composto (9) può essere prodotto derivatizzando il composto (14) ottenuto in un estere attivo, in un'anidride mista dell'acido, in un alogenuro dell'acido, o simili e facendolo reagire con il composto (4) in presenza di una base. Per la reazione, possono essere anche utilizzati i reagenti e le condizioni di reazione che vengono generalmente utilizzati per la sintesi peptidica, e le condizioni di reazione, i reagenti, la base, ed il solvente inerte utilizzati per la reazione possono essere scelti opportunamente da quelli descritti per la sintesi del composto (6).

Il composto (2) può anche essere prodotto mediante il seguente metodo, per esempio.

Deproteggendo il gruppo protettivo P^2 per il gruppo ammino del composto (13), può essere prodotto il composto (15). Per questa deprotezione, i reagenti e le condizioni possono essere scelti in relazione al gruppo protettivo.

Il composto (16) può essere prodotto derivatizzando il derivato dell'acido carbossilico (11) in un estere attivo, in un'anidride mista dell'acido, in un alogenuro dell'acido, o simili e facendolo reagire con il composto (15) ottenuto in presenza di una base. Le condizioni di reazione, i reagenti, la base, ed il solvente inerte utilizzati per formare un legame amidico tra l'acido carbossilico del peptide (11) ed il composto (15) possono essere scelti opportunamente da quelli descritti per la sintesi del composto (6).

Deproteggendo il gruppo protettivo per il gruppo carbossile del composto (16) ottenuto, può essere prodotto il composto (17). Questa deprotezione può essere realizzata in modo simile alla deprotezione di un gruppo carbossile per

produrre il composto (14).

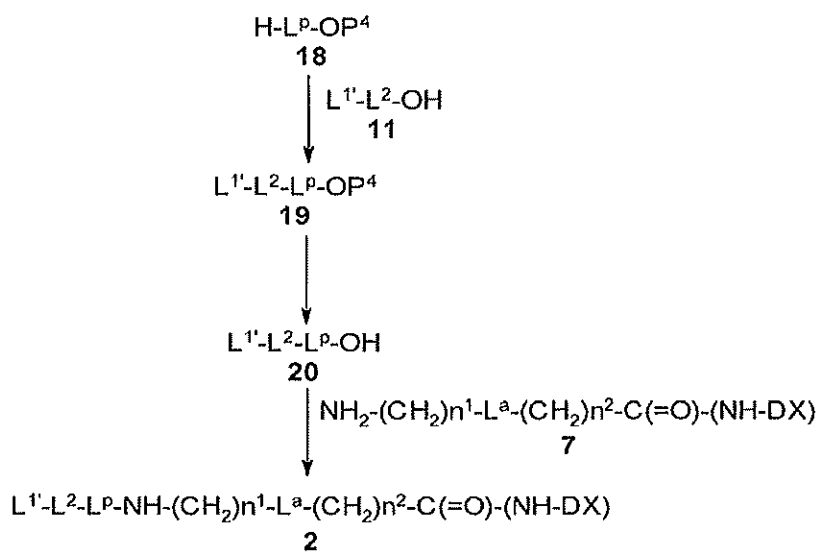
Il composto (2) può essere prodotto derivatizzando il composto (17) in un estere attivo, in un'anidride mista dell'acido, in un alogenuro dell'acido, o simili e facendolo reagire con il composto (4) in presenza di una base. Per la reazione, possono essere anche utilizzati i reagenti e le condizioni di reazione che vengono generalmente utilizzati per la sintesi peptidica, e le condizioni di reazione, i reagenti, la base, ed il solvente inerte utilizzati per la reazione possono essere scelti opportunamente da quelli descritti per la sintesi del composto (6).

5

3. Metodo di produzione 3

Il composto rappresentato dalla formula (2) di un intermedio può essere anche prodotto mediante il seguente metodo.

[Formula 23]



10

Nella formula, L^{1'} corrisponde ad L¹ avente una struttura in cui il terminale viene convertito in un gruppo maleimmidile, e P⁴ rappresenta un gruppo protettivo.

Il composto (19) può essere prodotto derivatizzando il composto (11) in un estere attivo, in un'anidride mista dell'acido, o simili e facendolo reagire in presenza di una base con l'acido carbossilico del peptide (18) avente il carbossiterminale protetto con P⁴. Le condizioni di reazione, i reagenti, la base, ed il solvente inerte utilizzati per formare un legame peptidico tra l'acido carbossilico del peptide (18) ed il composto (11) possono essere opportunamente scelti tra quelli descritti per la sintesi del composto (6). Il gruppo protettivo P⁴ per il gruppo carbossile del composto (18) può essere scelto opportunamente dal gruppo protettivo descritto sopra.

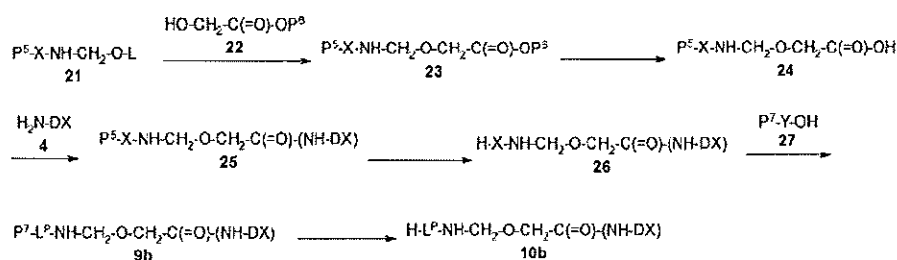
Deproteggendo il gruppo protettivo per il gruppo carbossile del composto (19) ottenuto, può essere prodotto il composto (20). Questa deprotezione può essere eseguita in modo simile alla deprotezione del gruppo carbossile per produrre il composto (14).

Il composto (2) può essere prodotto derivatizzando il composto (20) ottenuto in un estere attivo, in un'anidride mista dell'acido, o simili e facendolo reagire con il composto (7). Per la reazione, possono essere anche utilizzati i reagenti e le condizioni di reazione che vengono generalmente utilizzati per la sintesi peptidica, e le condizioni di reazione, i reagenti, la base, ed il solvente inerte utilizzati per la reazione possono essere scelti opportunamente da quelli descritti per la sintesi del composto (6).

4. Metodo di produzione 4

Qui sotto, viene descritto in dettaglio il metodo per produrre il composto (10b) avente n¹=1, L^A=O nell'intermedio di produzione (10) descritto nel metodo di produzione 2. Il composto rappresentato dalla formula (10b), un suo sale od un suo solvato possono essere prodotti secondo il seguente metodo, per esempio.

[Formula 24]



Nella formula, L^P è come definito sopra, L rappresenta un gruppo acile che è un gruppo alcanoile quale un gruppo acetile od un gruppo alloile quale un gruppo benzoile, un atomo di idrogeno, o simili, X ed Y rappresentano ciascuno un oligopeptide composto da 1 a 3 amminoacidi, P^5 e P^7 rappresentano ciascuno un gruppo protettivo per un gruppo ammino, e P^6 rappresenta un gruppo protettivo per un gruppo carbossile.

5 Un composto rappresentato dalla formula (21) può essere prodotto utilizzando od applicando il metodo descritto nel brevetto giapponese aperto al pubblico No. 2002-60351 o nella letteratura (J. Org. Chem., volume 51, pagina 3196, 1986), e conducendo la rimozione dei gruppi protettivi o la modificazione dei gruppi funzionali, se necessario. In alternativa, esso può essere ottenuto anche trattando un amminoacido con un gruppo ammino terminale protetto od un'ammide di un acido di un oligopeptide con un gruppo ammino protetto con un'aldeide o con un chetone.

10 Facendo reagire il composto (21) con il composto (22) avente un gruppo idrossile ad una temperatura variabile dalle condizioni di temperatura di raffreddamento alla temperatura ambiente in un solvente inerte in presenza di un acido o di una base, può essere prodotto il composto (23).

Esempi dell'acido che può essere utilizzato qui possono includere un acido inorganico quale acido fluoridrico, cloruro di idrogeno, acido solforico, acido nitrico, acido fosforico, ed acido bórico; un acido organico quale acido acetico, 15 acido citrico, acido paratoluensolfonico, ed acido metansolfonico; ed un acido di Lewis quale tetrafluoroborato, cloruro di zinco, cloruro di stagno, cloruro di alluminio, e cloruro di ferro. Tra essi, si preferiscono gli acidi solfonici, in particolare, l'acido paratoluensolfonico. Per quanto riguarda la base, una qualsiasi delle basi sopracitate può essere opportunamente scelta ed utilizzata. Loro esempi preferiti includono un alcossido di un metallo alcalino quale tert-butossido di potassio; un idrossido di un metallo alcalino quale idrossido di sodio ed idrossido di potassio; un idruo di 20 un metallo alcalino quale idruo di sodio ed idruo di potassio; una base organometallica rappresentata da dialchilammino litio quale diisopropilammide di litio; ed una base organometallica di bissilammina quale bis(trimetilsilil)ammide di litio. Esempi del solvente da utilizzare per la reazione includono un solvente etero quale tetraidrofurano ed 1,4-diossano; ed un solvente idrocarburico aromatico quale benzene e toluene. Quei solventi possono essere preparati come miscela con acqua. Inoltre, il gruppo protettivo per un gruppo ammino come esemplificato da P^5 non è particolarmente limitato 25 se è un gruppo comunemente utilizzato per la protezione di un gruppo ammino. Esempi rappresentativi includono i gruppi

protettivi per un gruppo ammino che vengono descritti nel metodo di produzione 2. Tuttavia, nella presente reazione, può esservi un caso in cui il gruppo protettivo per un gruppo ammino come esemplificato da P⁵ viene scisso. In tal caso, è necessario condurre una reazione con un reagente adatto per proteggere un gruppo ammino poiché può essere richiesto di introdurre ancora il gruppo protettivo.

5 Il composto (24) può essere prodotto rimuovendo il gruppo protettivo P⁶ del composto (23). Qui, gli esempi rappresentativi del gruppo protettivo per un gruppo carbossile come esemplificato da P⁶ vengono descritti nel metodo di produzione 2, ed uno adatto può essere scelto tra essi. Nel composto (23), è desiderabile che il gruppo protettivo P⁵ per un gruppo ammino ed il gruppo protettivo P⁶ per un gruppo carbossile siano i gruppi protettivi che possono essere rimossi mediante un metodo differente o differenti condizioni. Per esempio, un esempio rappresentativo comprende una
10 combinazione in cui P⁵ è un gruppo 9-fluorenilmetilossicarbonile e P⁶ è un gruppo benzile. I gruppi protettivi possono essere scelti in relazione, per esempio, alle proprietà di un composto avente un gruppo ammino ed un gruppo carbossile da proteggere. Per la rimozione dei gruppi protettivi, i reagenti e le condizioni vengono selezionati in relazione al gruppo protettivo.

15 Il composto (26) può essere prodotto derivatizzando l'acido carbossilico (24) in un estere attivo, in un'anidride mista dell'acido, in un alogenuro dell'acido, o simili e facendolo reagire con il composto (4) o con un suo sale farmacologicamente accettabile per produrre il composto (25) cui segue la rimozione del gruppo protettivo P⁵ del composto (25) ottenuto. Per la reazione tra il composto (4) e l'acido carbossilico (24) e per la reazione per rimuovere il gruppo protettivo P⁶, possono essere utilizzati gli stessi reagenti e condizioni di reazione di quelli descritti per il metodo di produzione 2.

20 Il composto (10b) può essere preparato facendo reagire il composto (26) con un amminoacido avente un gruppo ammino terminale protetto o con l'oligopeptide (27) avente un gruppo ammino protetto per produrre il composto (9b) e rimuovendo il gruppo protettivo P⁷ del composto (9b) ottenuto. Il gruppo protettivo per un gruppo ammino come rappresentato da P⁷ non è particolarmente limitato se viene in generale utilizzato per la protezione di un gruppo ammino. Suoi esempi rappresentativi includono i gruppi protettivi per un gruppo ammino che vengono descritti nel metodo di
25 produzione 2. Per rimuovere il gruppo protettivo, i reagenti e le condizioni vengono selezionati in relazione al gruppo

protettivo. Per la reazione tra il composto (26) ed il composto (27), possono essere impiegati i reagenti e le condizioni di reazione che vengono comunemente utilizzati per la sintesi peptidica. Il composto (10b) prodotto mediante il metodo sopracitato può essere derivatizzato nel composto (1) della presente invenzione secondo il metodo descritto sopra.

5 Il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione, quando viene lasciato all'aria o ricristallizzato, per esempio, per la purificazione, può assorbire umidità per avere un adsorbimento d'acqua o per trasformarsi in un idrato, e tali composto e sale contenenti acqua sono anch'essi inclusi nella presente invenzione.

10 Uno o più atomi costituenti il coniugato anticorpo-farmaco della presente invenzione possono contenere un isotopo atomico in un rapporto non naturale. Esempi dell'isotopo atomico includono deuterio (^2H), trizio (^3H), iodio 125 (^{125}I), e carbonio 14 (^{14}C). Inoltre, il composto della presente invenzione può essere marcato in modo radioattivo con un isotopo radioattivo quale trizio (^3H), iodio 125 (^{125}I), carbonio 14 (^{14}C), rame 64 (^{64}Cu), zirconio 89 (^{89}Zr), iodio 124 (^{124}I), fluoro 18 (^{18}F), indio 111 (^{111}I), carbonio 11 (^{11}C) e iodio 131 (^{131}I). Il composto marcato con un isotopo radioattivo è utile come agente terapeutico o profilattico, reagente per ricerca quale un reagente da saggio ed agente per la diagnosi quale un agente in vivo per l'imaging diagnostico. Senza essere collegata alla radioattività, qualsiasi tipo di variante dell'isotopo del coniugato anticorpo-farmaco della presente invenzione è nell'ambito della presente invenzione.

[Farmaci]

15 Il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione mostra un'attività citotossica nei confronti delle cellule cancerose, e così, può essere utilizzato come farmaco, in particolare come agente terapeutico e/o agente profilattico per il cancro.

20 Cioè, il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione può essere selettivamente utilizzato come farmaco per la chemioterapia, la quale è un metodo principale per trattare il cancro, e come risultato, può ritardare lo sviluppo delle cellule cancerose, inibire la loro crescita, ed inoltre uccidere le cellule cancerose. Questo può permettere ai pazienti con il cancro di essere privi dei sintomi causati dal cancro o di ottenere un miglioramento della QOL dei pazienti con il cancro e raggiunge un effetto terapeutico sostenendo le vite dei pazienti con il cancro. Anche se il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione non riesce ad uccidere le cellule cancerose, esso può ottenere

25

una QOL superiore dei pazienti con il cancro ottenendo nel mentre la loro sopravvivenza a lungo termine, inibendo o controllando la crescita delle cellule cancerose.

In tale terapia con il farmaco, esso può essere utilizzato come farmaco da solo così come farmaco in combinazione con un'ulteriore terapia in una terapia adiuvante e può essere combinato con un'operazione chirurgica, con una radioterapia, con una terapia ormonale, o simili. Inoltre, esso può anche essere utilizzato come farmaco per la terapia farmacologica in una terapia neoadiuvante.

Oltre all'uso terapeutico come descritto sopra, può anche essere atteso un effetto di soppressione della crescita di minime cellule cancerose metastatiche e di loro ulteriore uccisione legandosi a queste cellule cancerose in virtù della proprietà di legame dell'anticorpo all'antigene. In particolare, quando l'espressione di TROP2 è confermata in cellule cancerose primarie, possono essere attesi l'inibizione delle metastasi tumorali od un effetto profilattico somministrando il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione. Per esempio, possono essere attesi un effetto di inibizione e di uccisione delle cellule cancerose in un fluido corporeo nel corso di metastasi od un effetto, per esempio, di inibizione e di uccisione di cellule cancerose minime immediatamente dopo l'impianto in qualsiasi tessuto. Inoltre, possono essere attesi l'inibizione delle metastasi tumorali od un effetto profilattico, in particolare, dopo la rimozione chirurgica del cancro. Conseguentemente, può essere atteso un effetto di inibizione delle metastasi tumorali.

Può essere atteso che il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione eserciti un effetto terapeutico mediante somministrazione come terapia sistemica ai pazienti, ed inoltre, mediante somministrazione locale ai tessuti cancerosi.

Esempi del tipo di cancro nei confronti del quale il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione può essere utilizzato includono il cancro del polmone, il cancro del rene, il cancro dell'urotelio, il cancro del colon-retto, il cancro della prostata, il glioblastoma multiforme, il cancro dell'ovaio, il cancro del pancreas, il cancro della mammella, il melanoma, il cancro del fegato, il cancro della vescica, il cancro dello stomaco, il carcinoma del collo dell'utero, il cancro della testa e del collo, od il cancro dell'esofago, tuttavia, non sono limitati ad essi purché sia una cellula cancerosa esprimente, in una cellula cancerosa come soggetto del trattamento, una proteina che l'anticorpo all'interno del coniugato anticorpo-farmaco può riconoscere.

Il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione può essere preferibilmente somministrato ad un mammifero, ma è più preferibilmente somministrato ad un essere umano.

5 Le sostanze utilizzate in una composizione farmaceutica comprendente un coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione possono essere opportunamente scelte ed applicate dagli additivi di formulazione o simili che sono utilizzati in generale nell'arte, in vista del dosaggio o della concentrazione di somministrazione.

10 Il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione può essere somministrato come composizione farmaceutica comprendente almeno un componente farmaceuticamente adatto. Per esempio, la composizione farmaceutica sopra contiene tipicamente almeno un veicolante farmaceutico (per esempio liquido sterilizzato). Qui, il liquido include, per esempio, acqua ed olio (olio di petrolio ed olio di origine animale, di origine
15 vegetale, o di origine sintetica). L'olio può essere, per esempio, olio di arachidi, olio di soia, olio minerale, oppure olio di sesamo. L'acqua è un veicolante più tipico quando la composizione farmaceutica sopra è somministrata per via endovenosa. Anche una soluzione salina, una soluzione acquosa di destrosio, ed una soluzione acquosa di glicerolo possono essere utilizzate come veicolante liquido, in particolare, per una soluzione per iniezione. Un veicolo farmaceutico
20 adatto è noto nell'arte. Se si desidera, la composizione sopra può anche contenere una quantità in tracce di un agente idratante, di un agente emulsionante, o di un agente tamponante del pH. Esempi di un veicolante farmaceutico adatto vengono descritti in "Remington's Pharmaceutical Sciences" di E. W. Martin. Le formulazioni corrispondono ad una
25 modalità di somministrazione.

Sono noti vari sistemi di rilascio ed essi possono essere utilizzati per somministrare il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione. Esempi della via di somministrazione includono le vie intradermica,
20 intramuscolare, intraperitoneale, endovenosa, e sottocutanea, ma non sono limitati a queste. La somministrazione può essere fatta mediante iniezione od iniezione in bolo, per esempio. Secondo una forma di realizzazione specifica preferita, la somministrazione del coniugato anticorpo-farmaco viene eseguita mediante iniezione. La somministrazione parenterale è una via di somministrazione preferita.

25 Secondo una forma di realizzazione rappresentativa, la composizione farmaceutica viene prescritta come composizione farmaceutica adatta per una somministrazione endovenosa all'uomo, secondo le procedure convenzionali.

La composizione per la somministrazione endovenosa è tipicamente una soluzione in una soluzione tampone acquosa sterile ed isotonica. Se necessario, il farmaco può contenere un agente solubilizzante ed anestetici locali per alleviare il dolore al sito di iniezione (per esempio lignocaina). Generalmente, il componente sopra viene fornito singolarmente come uno qualsiasi tra una polvere liofilizzata od un concentrato anidro contenuto in un contenitore che viene ottenuto sigillando una fiala od una bustina avente una quantità del principio attivo o come miscela in una forma di dosaggio unitaria. Quando il farmaco è nella forma di somministrazione mediante iniezione, esso può essere somministrato da una bottiglia per iniezione contenente acqua o soluzione salina di grado farmaceutico sterile. Quando il farmaco viene somministrato mediante iniezione, una fiala d'acqua sterile o di soluzione salina per iniezione può essere fornita in modo tale che i componenti sopracitati vengano miscelati l'uno con l'altro prima della somministrazione.

La composizione farmaceutica della presente invenzione può essere una composizione farmaceutica comprendente solo il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente domanda od una composizione farmaceutica comprendente il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco ed almeno un agente di trattamento del cancro diverso dal coniugato. Il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco della presente invenzione può essere somministrato con un altro agente di trattamento del cancro. L'effetto antitumorale può essere aumentato di conseguenza. Un altro agente antitumorale utilizzato per tale scopo può essere somministrato ad un individuo simultaneamente al coniugato anticorpo-farmaco, separatamente da questo, o successivamente a questo, e può essere somministrato variando nel mentre l'intervallo di somministrazione per ciascuno. Esempi dell'agente di trattamento del cancro includono abraxano, paclitaxel, cisplatino, gemcitabina, irinotecano (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinorelbina, farmaci descritti nella pubblicazione internazionale WO 2003/038043, analoghi di LH-RH (leuprorelina, goserelina, o simili), estramustina fosfato, un antagonista degli estrogeni (tamoxifene, raloxifene, o simili), ed un inibitore dell'aromatasi (anastrozolo, letrozolo, exemestano, o simili), ma non sono limitati purché sia un farmaco avente un'attività antitumorale.

La composizione farmaceutica può essere formulata in una formulazione liofilizzata od in una formulazione liquida come una formulazione avente la composizione desiderata e la purezza richiesta. Quando formulata come formulazione liofilizzata, essa può essere una formulazione contenente additivi di formulazione adatti che vengono utilizzati nell'arte. Inoltre, per una formulazione liquida, essa può essere formulata come formulazione liquida contenente

vari additivi di formulazione che vengono utilizzati nell'arte.

La composizione e la concentrazione della composizione farmaceutica possono variare in relazione al metodo di somministrazione. Tuttavia, il coniugato anticorpo anti-TROP2-farmaco contenuto nella composizione farmaceutica della presente invenzione può mostrare l'effetto farmaceutico perfino ad un piccolo dosaggio quando il coniugato anticorpo-farmaco ha un'affinità superiore per un antigene, cioè, un'affinità superiore (=valore di Kd inferiore) in termini della costante di dissociazione (cioè, il valore di Kd) per l'antigene. Così, per determinare il dosaggio del coniugato anticorpo-farmaco, il dosaggio può essere determinato alla luce di una situazione relativa all'affinità tra il coniugato anticorpo-farmaco e l'antigene. Quando il coniugato anticorpo-farmaco della presente invenzione viene somministrato ad un uomo, per esempio, circa da 0,001 mg/kg a 100 mg/kg possono essere somministrati una volta o somministrati diverse volte con un intervallo di tempo da 1 a 180 giorni.

Esempi

La presente invenzione viene descritta specificamente in vista degli esempi mostrati sotto. Tuttavia, la presente invenzione non è limitata ad essi. Inoltre, non è per niente interpretata in un modo limitato. Inoltre, se non descritto specificamente altrimenti, il reagente, il solvente, ed il materiale di partenza descritti nella descrizione possono essere facilmente ottenuti da un fornitore commerciale.

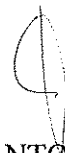
[Esempio 1: immunizzazione di un topo ed ottenimento di un ibridoma]

1-1) Preparazione della cellula da utilizzare nell'immunizzazione di un topo

5×10^6 cellule NCI-H322 (linea cellulare umana di cancro del polmone a cellule non piccole, ATCC CRL-5806; ATCC: American Type Culture Collection) sono state sottoposte a coltura in un terreno RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640) (10 ml) per 5 giorni, quindi recuperate, lavate con PBS (soluzione salina tamponata con fosfato) due volte, e risospese in PBS (500 μ l).

1-2) Immunizzazione di un topo

Per la prima immunizzazione, ciascun topo BALB/c (6 settimane di età) è stato immunizzato per via intraperitoneale con cellule NCI-H322 (1×10^7 cellule). Per le immunizzazioni dalla seconda alla quinta, il topo è stato immunizzato per via intraperitoneale con 1×10^6 cellule NCI-H322 ad intervalli di 1 settimana. Per la sesta



immunizzazione (finale), il topo è stato immunizzato attraverso la vena caudale e per via intraperitoneale con le cellule NCI-H322 ad 1×10^6 cellule/200 μ l di PBS per ciascuna via. Le cellule della milza sono state asportate 3 giorni dopo l'immunizzazione finale.

1-3) Preparazione di cellule della milza di un topo immunizzato

5 La milza del topo immunizzato è stata asportata, quindi macinata, e sospesa in un terreno RPMI 1640 con FBS al 10% (siero fetale bovino). La sospensione cellulare è stata fatta passare attraverso un filtro cellulare (100 μ m, BD Falcon) e quindi centrifugata a 1.500 giri/min a temperatura ambiente per 5 minuti, ed il surnatante è stato eliminato. Una soluzione di Tris-NH₄Cl (Tris-HCl 20mM pH 7,5, NH₄Cl allo 0,83%; 10 ml) è stata aggiunta al residuo, cui è seguito il trattamento a temperatura ambiente per 5 minuti. Un terreno RPMI 1640 con FBS (10 ml) è stato aggiunto alla
10 sospensione cellulare, e la miscela è stata fatta passare attraverso un filtro cellulare e quindi centrifugata a 1.500 giri/min a temperatura ambiente per 5 minuti. Il surnatante è stato eliminato, e le cellule della milza sono state risospese in un terreno RPMI 1640 privo di FBS (10 ml).

1-4) Preparazione di cellule di mieloma

15 Cellule P3U1 (linea cellulare murina di mieloma) sono state recuperate e centrifugate a 1.500 giri/min a temperatura ambiente per 5 minuti. Una soluzione di EDTA (0,02%) (10 ml) è stata aggiunta alle cellule P3U1, cui è seguito il trattamento a 37°C per 5 minuti. La sospensione di cellule P3U1 è stata centrifugata a 1.500 giri/min a temperatura ambiente per 5 minuti. Il surnatante è stato eliminato e risospeso in un terreno RPMI 1640 privo di FBS (10 ml).

1-5) Fusione cellulare

20 Le cellule della milza e le cellule di mieloma sono state miscelate in un rapporto di 5:1 e centrifugate (1200 giri/min, 5 minuti). Le cellule ottenute nella frazione precipitata sono state ben separate, e polietilenglicole-4000 (PEG-4000; 1 ml) vi è stato quindi gradualmente aggiunto per circa 1 minuto con agitazione. Quindi, un terreno RPMI (1 ml) è stato aggiunto al fluido contenente le cellule diverse volte con intervalli di 1 minuto ed un terreno RPMI vi è stato quindi aggiunto per regolare la quantità totale a 50 ml. La sospensione cellulare è stata centrifugata (900 giri/min, 5 minuti), e le
25 cellule ottenute nella frazione precipitata sono state moderatamente separate e quindi delicatamente sospese in un terreno

HAT (terreno RPMI 1640 arricchito con siero fetale bovino al 10% e con supplemento per terreno HAT; 100 ml). La sospensione è stata distribuita a 200 µl/pozzetto ad una piastra per coltura da 96 pozzetti e sottoposta a coltura fino al 50% di confluenza in un incubatore con CO₂ al 5% a 37°C.

1-6) Esame dell'ibridoma utilizzando un adenovirus variante FZ33

5 Le cellule NCI-H322 sono state seminate a 5×10^3 cellule/pozzetto in una piastra da 96 pozzetti e sottoposte a coltura a 37°C per 48 ore. Le cellule sono state lavate con 150 µl/pozzetto di PBS due volte, e ciascun surnatante delle colture di ibridomi (50 µl) è stato aggiunto a ciascun pozzetto e fatto reagire a 4°C per 1 ora. Le cellule sono state lavate con 150 µl/pozzetto di PBS due volte. Un adenovirus Ax3CAZ3-FZ33 (adenovirus esprimente β-galattosidasi modificato con la fibra Z33 in modo tale da legarsi ad un anticorpo (si veda la pubblicazione della domanda di brevetto US
10 2012/0237518)) è stato diluito con un terreno RPMI 1640 privo di siero ad una concentrazione di 3×10^6 vp/100 µl (1×10^3 vp/cellula), e questa soluzione diluita vi è stata aggiunta a 100 µl/pozzetto. Dopo reazione a 4°C per 1 ora, le cellule sono state lavate con 150 µl/pozzetto di PBS due volte. Un terreno RPMI 1640 con FBS vi è stato aggiunto a 100 µl/pozzetto, e le cellule sono state sottoposte a coltura a 37°C per 24 ore. Le cellule NCI-H322 trattate con un saggio per il gene reporter della β-gal utilizzando un sistema di saggio per il gene reporter Galacto-Light Plus (Applied Biosystems, Inc.)
15 sono state lavate con 200 µl/pozzetto di PBS. La soluzione di lisi vi è stata aggiunta a 50 µl/pozzetto, e la miscela è stata lasciata a temperatura ambiente per 10 minuti. Questo lisato cellulare (10 µl) è stato diluito 100 volte con un diluente Galacton-Plus del tampone di reazione di Galacto, quindi aggiunto ad una piastra SH a micropozzetti bianchi da 96 pozzetti (Nunc/Thermo Fisher Scientific, Inc.), e fatto reagire a temperatura ambiente per 1 ora. Un acceleratore II vi è stato aggiunto a 150 µl/pozzetto. La chemiluminescenza è stata misurata per 5 secondi utilizzando un contatore Wallac
20 1420 ARVOsx per multimarcatatura (PerkinElmer, Inc.) e la dose infettiva del virus nelle cellule NCI-H322 è stata indicata con il valore medio per secondo come RLU (quantità di luminescenza). Nell'esame del gruppo degli ibridomi così eseguito, un clone il cui valore di misurazione (RLU) è stato 5.000 RLU o superiore è stato scelto dall'intero gruppo (minimo: 1.383 RLU, medio: 10.914 RLU, massimo: 78.746 RLU). Innanzitutto, come esame primario, 81 pozzetti positivi sono stati scelti tra 960 pozzetti di ibridomi ottenuti mediante una fusione cellulare. Come esame di convalida, è
25 stato ulteriormente condotto un saggio in duplice copia mediante lo stesso approccio come nell'esame primario. Quando

un pozzetto che ha mostrato un valore di misurazione di 5.000 RLU o superiore in entrambe le prove è stato considerato come positivo, 52 pozzetti positivi sono stati scelti dagli 81 pozzetti ottenuti nell'esame primario. I cloni scelti sono stati subclonati da 2 a 4 volte per stabilire 44 linee cellulari monoclonali di ibridomi.

[Esempio 2: purificazione dell'anticorpo dall'ibridoma]

5 Pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano; 0,5 ml) è stato somministrato per via intraperitoneale in anticipo a ciascun topo vecchio o topo nudo da 8 a 10 settimane d'età, il quale è stato quindi cresciuto per 2 settimane. Ciascun ibridoma che produce un anticorpo monoclonale ottenuto nell'esempio 1 è stato iniettato per via intraperitoneale al topo. Dopo da 10 a 21 giorni, all'ibridoma è stato permesso di causare una cancerizzazione ascitica, e l'ascite è stato quindi raccolto. L'ascite ottenuto è stato centrifugato per rimuovere la materia solida. Quindi, gli anticorpi sono stati purificati
10 mediante salatura con solfato d'ammonio dal 40% al 50%, un metodo di precipitazione con acido caprilico, una colonna DEAE-Sepharose, ed una colonna con la proteina G, e frazioni di IgG o di IgM sono state raccolte ed utilizzate come anticorpi monoclonali purificati.

[Esempio 3: identificazione dell'antigene a cui si lega l'anticorpo prodotto dall'ibridoma]

È stato identificato un antigene per TINA1, un anticorpo prodotto dall'ibridoma preparato nell'esempio 2.

15 3-1) Immunoprecipitazione di una proteina della superficie cellulare marcata con biotina utilizzando l'anticorpo TINA1
5×10⁶ cellule NCI-H322 sono state recuperate e lavate con PBS tre volte. Solfo-NHS-biotina EZ-Link (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Inc.) è stata sospesa in PBS ad una concentrazione di 0,1 mg/ml. Le cellule NCI-H322 sono state fatte ruotare a temperatura ambiente per 30 minuti in una soluzione di biotina/PBS, quindi lavate con una soluzione di glicina 100mM/PBS (25 ml) due volte, e quindi lavate con PBS (25 ml) tre volte. Le cellule così lavate sono
20 state risospese in un tampone di lisi (NaCl 150mM, Tris-HCl 50mM pH 7,6, NP-40 all'1%+inibitore delle proteasi, 1 compressa/50 ml di EDTA libero completo (Hoffmann-La Roche Ltd.); 2 ml) e trattate a 4°C per 30 minuti. Il tampone di Sepharose con la proteina G/di lisi (impasto al 50%; 30 µl) ottenuto sostituendo un tampone di Sepharose con la proteina G (Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Japan Corporation)) con un tampone di lisi è stato aggiunto al lisato cellulare, e la miscela è stata fatta ruotare a 4°C per 1 ora e quindi centrifugata a 4°C per 5 minuti per recuperare
25 un surnatante. L'anticorpo TINA1 (3 µg) è stato aggiunto al surnatante, e la miscela è stata fatta ruotare a 4°C per 1 ora.



Quindi, il tampone Sepharose con la proteina G/di lisi (impasto al 50%; 60 µl) vi è stato aggiunto, e la miscela è stata fatta ruotare a 4°C per 2 ore. Sepharose con la proteina G è stato lavato con un tampone di lisi (1 ml) sei volte e quindi risospeso in un tampone per campioni con SDS 1×/tampone con 2-ME (2-mercaptoetanololo) al 5% (Tris-HCl 62,5mM (pH 6,8 a 25°C), SDS al 2% (p/v), glicerolo al 10%, e rosso fenolo allo 0,01% (p/v)). La sospensione è stata trattata a 100°C per 5 minuti, e la soluzione è stata quindi recuperata ed utilizzata come campione per l' SDS-PAGE (elettroforesi su gel di poliacrilammide).

3-2) SDS-PAGE e Western blotting

Il campione per l' SDS-PAGE preparato in 3-1) è stato sottoposto ad elettroforesi a 20 mA utilizzando Ready Gels J dal 5% al 20% (Bio-Rad Laboratories, Inc.) e quindi trasferito a 0,1 mA/cm² dal gel alla membrana. La membrana è stata lavata con PBS-T (PBS(-)-Tween 20 allo 0,05%) per 5 minuti e quindi bloccata per 1 ora. La membrana è stata lavata con PBS-T per 5 minuti tre volte e quindi fatta reagire con un coniugato perossidasi di rafano-streptavidina (Amersham Biosciences Corp.; diluito 2.000 volte con PBS-T per l'uso) per 1 ora. La membrana è stata lavata con PBS-T per 10 minuti quattro volte, ed una banda bersaglio è stata quindi rilevata utilizzando reagenti ECL per il rilevamento di Western blotting (Amersham Biosciences Corp.) ed iperfilm ECL (Amersham Biosciences Corp.). Le cellule NCI-H322 marcate con biotina mediante le procedure dell'esempio 3-1) sono state sottoposte ad immunoprecipitazione con un anticorpo KCI7A3 il cui antigene è già stato trovato essere TROP2 mediante spettrometria di massa, o l' anticorpo TINA1, ed i prodotti immunoprecipitati ottenuti sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e Western blotting in presenza od in assenza di DTT. In ciascun caso di utilizzo dell' anticorpo KCI7A3 o dell' anticorpo TINA1, è stata rilevata una banda ad un peso molecolare di 46 kDa in assenza di DTT, ed è stata rilevata una banda ad un peso molecolare di 37 kDa nei campioni arricchiti con DTT.

3-3) Analisi FACS

Poiché è stato previsto dal profilo di bande che l' antigene dell' anticorpo TINA1 è TROP2, l' analisi di sovraespressione mediante trasferimento genico di cDNA è stata condotta senza spettrometria di massa. Come risultato dell' analisi FACS, l' anticorpo TINA1 ha mostrato una forte risposta positiva in cellule CHOK1 esprimenti TROP2 umana, indicante che l' antigene dell' anticorpo TINA1 è TROP2. Un' analisi FACS simile è stata condotta utilizzando una

linea cellulare di cancro del polmone PC14, una linea cellulare di cancro del polmone NCI-H322, una linea cellulare di cancro del polmone NCI-H2122, una linea cellulare di cancro del polmone LCAM1, una linea cellulare di cancro del polmone LC2/ad, una linea cellulare di cancro del pancreas MIAPaCa2, una linea cellulare di cancro del pancreas PK-1, una linea cellulare di cancro della prostata PC3, una linea cellulare di cancro del colon-retto HCT116, una linea cellulare di melanoma A375, una linea cellulare di cancro dell'ovaio SKOV3, una linea cellulare di tumore ematopoietico RPMI8226, una linea cellulare di tumore ematopoietico K562, PBMC (cellule mononucleate umane del sangue periferico), e piastrine umane. Tutte le linee cellulari di cancro del polmone esaminate erano positive per TROP2, e PC3, PK-1, e SKOV3 erano positive come le linee cellulari tranne che per quelle di cancro del polmone. D'altra parte, tutte le cellule del sangue normali erano negative.

10 [Esempio 4: misurazione dell'attività di internalizzazione dell'anticorpo]

4-1) Sistema di valutazione dell'attività di internalizzazione dell'anticorpo

Una proteina di fusione ricombinante DT3C è stata prodotta allo scopo di misurare l'attività di internalizzazione e l'attività di immunotossina di un anticorpo. Questa DT3C è una proteina avente un dominio catalitico della tossina difterica (DT) e tre regioni di legame all'anticorpo della proteina G. DT3C si lega specificamente ad un gruppo funzionale Fc di un anticorpo, è stabile, ed induce morte cellulare inibendo la sintesi proteica quando internalizzata nelle cellule. Mediante l'uso di questo sistema, l'effetto di internalizzazione dell'anticorpo ed il suo effetto citocida mediante immunotossina possono essere osservati allo stesso tempo (Yamaguchi, M., Hamada, H, et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 454 (2014) da 600 a 603).

4-2) Valutazione dell'attività di internalizzazione e dell'attività di immunotossina utilizzando DT3C

20 4 µg/ml di DT3C sono stati aggiunti a 25 µl/pozzetto ad una piastra da 96 pozzetti, inoltre i surnatanti della coltura di 11 ibridomi ottenuti mediante il metodo dell'esempio 1 od un metodo equivalente a questo sono stati aggiunti ciascuno a 25 µl/pozzetto alla piastra, e la piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 30 minuti. È stato confermato in anticipo che gli antigeni riconosciuti dagli anticorpi prodotti dagli ibridomi diversi dall'ibridoma che produce anticorpi per TINA1 sono CD9, CD46, CD55, CD59, CD71, CD73, CD147, CD276, EpCAM, od EGFR. 2×10⁴ cellule/ml (terreno RPMI 1640 arricchito con FBS a basse IgG al 20%) di cellule NCI-H322 sono state ivi seminate a 50 µl/pozzetto. Dopo

l'incubazione a temperatura ambiente per 30 minuti, le cellule sono state sottoposte a coltura per 3 giorni in un incubatore con CO₂ a 37°C. Dopo la coltura, il surnatante è stato rimosso, e l'RPMI 1640 con FBS al 10% con WST al 10% è stato aggiunto a 100 µl/pozzetto alla piastra. Dopo l'incubazione per 1 ora in un incubatore con CO₂ a 37°C, il numero di cellule vive è stato misurato utilizzando un lettore per micropiastre (da OD₄₅₀ ad OD₆₄₀, Infinite 200, Tecan Trading AG).

5 Tra i surnatanti della coltura delle cellule di ibridoma valutate, è stato confermato che gli anticorpi contro CD59, CD71, EGFR, EpCAM, o TROP2 hanno una forte attività di internalizzazione ed un'attività di immunotossina (figura 10).

4-3) Differenza nell'attività di internalizzazione e nell'attività di immunotossina tra anticorpi contro CD59, CD71, EGFR, EpCAM, o TROP2

10 Ciascuna soluzione diluita di DT3C (0 µg/ml, 0,004 µg/ml, 0,04 µg/ml, 0,4 µg/ml, 4 µg/ml, o 40 µg/ml) è stata aggiunta a 25 µl/pozzetto ad una piastra da 96 pozzetti, quindi ciascun anticorpo (40 µg/ml) è stato aggiunto a 25 µl/pozzetto alla piastra, e la piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 30 minuti. Inoltre, 2×10⁴ cellule/ml (terreno RPMI 1640 arricchito con FBS a basse IgG al 20%) di cellule NCI-H322 sono state ivi seminate a 50 µl/pozzetto. Dopo l'incubazione a temperatura ambiente per 30 minuti, le cellule sono state sottoposte a coltura per 3 giorni in un incubatore con CO₂ a 37°C. Dopo la coltura, il surnatante è stato rimosso, ed l'RPMI 1640 con FBS al 10% con WST
15 dall'1% al 10% è stato aggiunto a 100 µl/pozzetto alla piastra. Dopo l'incubazione per 1 ora in un incubatore con CO₂ a 37°C, il numero di cellule vive è stato misurato utilizzando un lettore per piastre (da OD₄₅₀ ad OD₆₄₀). Tra gli anticorpi valutati, TINA1, un anticorpo contro TROP2, ha avuto le più forti attività di internalizzazione ed attività di immunotossina (figura 11).

4-4) Differenza nell'attività di internalizzazione e nell'attività di immunotossina tra cloni dell'anticorpo anti-TROP2

20 Anticorpi anti-TROP2 TINA1 (immunogeno: linea NCI-H322 di cancro del polmone), KCL7A3 e KCL2D6 (immunogeno: linea cellulare di cancro del pancreas KCL-MOH1), Pr1E11 e Pr8H10 (immunogeno: linea cellulare di cancro della prostata Pc-1), ed NY16 ed NY17 (immunogeno: linea cellulare di cancro del pancreas PK-1) ottenuti secondo il metodo dell'esempio 1 od un metodo equivalente a questo, e 77220 disponibile in commercio (R&D Systems Inc.) sono stati valutati per le loro attività di internalizzazione ed attività di immunotossina nello stesso modo dell'esempio
25 4-3). Di conseguenza, tra gli 8 anticorpi anti-TROP2, l'anticorpo TINA1 ha avuto l'attività più forte (figura 12).

[Esempio 5: determinazione della sequenza nucleotidica del cDNA codificante per la regione variabile del gene dell'anticorpo TINA1 e produzione di un anticorpo chimerico per TINA1 (di seguito, indicato come cTINA1)]

5-1) Determinazione della sequenza nucleotidica del cDNA codificante per la regione variabile del gene dell'anticorpo TINA1
5-1-1) Preparazione dell'mRNA dall'ibridoma che produce anticorpi per TINA1

5 Allo scopo di amplificare i cDNA codificanti per le regioni variabili dell'anticorpo TINA1, è stato preparato mRNA dall'ibridoma che produce anticorpi per TINA1 utilizzando un kit di isolamento dell'mRNA (Roche Applied Science).

5-1-2) Sintesi di cDNA (cDNA 5'-RACE-Ready) Il cDNA (cDNA 5'-RACE-Ready) è stato sintetizzato utilizzando l'mRNA (100 ng) preparato in 5-1-1), ed un kit di amplificazione del cDNA SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.).

5-1-3) Amplificazione del cDNA codificante per la regione variabile della catena pesante dell'anticorpo TINA1 mediante PCR 5'-RACE, e determinazione della sequenza

15 Un'UPM (miscela universale A di inneschi: inclusa nel kit di amplificazione del cDNA SMARTer RACE) ed un oligonucleotide avente una sequenza di 5'-AGAGTTCCAGGTCAAGGTCAGG-3' (SEQ ID NO: 33: innesco mG2aVR2) sono stati utilizzati come inneschi per amplificare il cDNA della regione variabile del gene della catena pesante mediante PCR. È stata utilizzata l'UPM inclusa nel kit di amplificazione del cDNA SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.), ed mG2aVR2 è stato progettato dalla sequenza di una regione costante di una catena pesante (IgG2a) di topo su una banca dati.

20 Il cDNA codificante per la regione variabile della catena pesante dell'anticorpo TINA1 è stato amplificato mediante PCR 5'-RACE utilizzando questa serie di inneschi ed il cDNA (cDNA 5'-RACE-Ready) sintetizzato nell'esempio 5-1-2) come stampo. Questa PCR è stata effettuata secondo il manuale del kit di amplificazione del cDNA SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) sul programma di PCR Touchdown utilizzando KOD-Plus (Toyobo Co., Ltd.) come polimerasi.

25 Il cDNA codificante per la regione variabile della catena pesante amplificato mediante PCR 5'-RACE è stato purificato utilizzando un kit di purificazione per PCR MinElute (QIAGEN N.V.) e quindi clonato utilizzando un kit di

clonaggio per PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen Corp.). La sequenza nucleotidica del cDNA codificante per la regione variabile della catena pesante clonata è stata analizzata mediante sequenziamento. Gli inneschi di sequenziamento utilizzati sono stati l'innesco mG2aVR2 descritto sopra progettato dalla sequenza di una regione costante di una catena pesante di topo su una banca dati, e NUP (innesco universale intercalato A: incluso nel kit di amplificazione del cDNA SMARTer RACE).

L'analisi di sequenziamento è stata realizzata utilizzando un apparecchio per l'analisi della sequenza genica ("ABI PRISM 3700 DNA Analyzer" od "Applied Biosystems 3730xl Analyzer", Applied Biosystems, Inc.) e la reazione di sequenziamento ha impiegato Gene Amp 9700 (Applied Biosystems, Inc.).

La sequenza nucleotidica determinata del cDNA codificante per la regione variabile della catena pesante dell'anticorpo TINA1 viene mostrata nella SEQ ID NO: 1 dell'elenco delle sequenze, e la sequenza amminoacidica codificata quindi viene mostrata nella SEQ ID NO: 2.

5-1-4) Amplificazione del cDNA codificante per la regione variabile della catena leggera dell'anticorpo TINA1 mediante PCR 5'-RACE, e determinazione della sequenza

Un'UPM (miscela universale A di inneschi: inclusa nel kit di amplificazione del cDNA SMARTer RACE) ed un oligonucleotide avente una sequenza di 5'-AGTCCAAGTGTTCAGGACGCCATTTTGTCG-3' (SEQ ID NO: 34: innesco mKVR2) sono stati utilizzati come inneschi per amplificare il cDNA della regione variabile del gene della catena leggera dell'anticorpo TINA1 mediante PCR. È stata utilizzata l'UPM inclusa nel kit di amplificazione del cDNA SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.), e mKVR2 è stato progettato dalla sequenza di una regione costante di una catena leggera di topo su una banca dati.

Il cDNA codificante per la regione variabile della catena leggera dell'anticorpo TINA1 è stato amplificato mediante PCR 5'-RACE utilizzando questa serie di inneschi ed il cDNA (cDNA 5'-RACE-Ready) sintetizzato nell'esempio 5-1-2) come stampo. Questa PCR è stata effettuata secondo il manuale del kit di amplificazione del cDNA SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) sul programma di PCR Touchdown utilizzando KOD-Plus (Toyobo Co., Ltd.) come polimerasi.

Il cDNA codificante per la regione variabile della catena leggera amplificato mediante PCR 5'-RACE è stato

purificato utilizzando un kit di purificazione per PCR MinElute (QIAGEN N.V.) e quindi clonato utilizzando un kit di clonaggio per PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen Corp.). La sequenza nucleotidica del cDNA codificante per la regione variabile della catena leggera clonata è stata analizzata mediante sequenziamento.

Gli inneschi di sequenziamento utilizzati sono stati l'innesco mKVR2 descritto sopra progettato dalla sequenza di una regione costante di una catena leggera di topo su una banca dati, e NUP.

L'analisi di sequenziamento e la reazione di sequenziamento hanno impiegato l'apparecchio descritto sopra.

La sequenza nucleotidica determinata del cDNA codificante per la regione variabile della catena leggera dell'anticorpo TINA1 viene mostrata nella SEQ ID NO: 3 dell'elenco delle sequenze, e la sequenza amminoacidica codificata quindi viene mostrata nella SEQ ID NO: 4.

5-2) Produzione dell'anticorpo cTINA1

5-2-1) Costruzione di un vettore di espressione pCMA-LK della catena leggera dell'anticorpo chimerico ed umanizzato

Un frammento di circa 5,4 kb ottenuto digerendo un plasmide pcDNA3.3-TOPO/LacZ (Invitrogen Corp.) con enzimi di restrizione XbaI e PmeI, ed un frammento di DNA contenente una sequenza di DNA codificante per un segnale di secrezione della catena κ umana ed una regione costante della catena κ umana mostrata nella SEQ ID NO: 5 sono stati ligati utilizzando un kit di clonaggio per PCR In-Fusion Advantage (Clontech Laboratories, Inc.) per produrre pcDNA3.3/LK.

pcDNA3.3/LK è stato utilizzato come stampo nella PCR utilizzando una serie di inneschi descritta sotto. Il frammento ottenuto di circa 3,8 kb è stato fosforilato e quindi autoligato per costruire un vettore di espressione pCMA-LK della catena leggera dell'anticorpo chimerico ed umanizzato avente una sequenza segnale, un sito di clonaggio, ed il gene della regione costante della catena κ umana a valle del promotore del CMV. Serie di inneschi

5'-tataccgctgacctctagctagagcttggc-3' (SEQ ID NO: 35: innesco 3.3-F1)

5'-gctatggcagggcctgccgccccgacgttg-3' (SEQ ID NO: 36: innesco 3.3-R1)

5-2-2) Costruzione di un vettore di espressione pCMA-G1 della catena pesante di tipo IgG1 dell'anticorpo chimerico ed umanizzato

Un frammento di DNA di pCMA-LK mancante della sequenza di DNA codificante per un segnale di secrezione

della catena κ umana e di una regione costante della catena κ umana mediante digestione con XbaI e PmeI, ed un frammento di DNA contenente una sequenza di DNA codificante per gli amminoacidi di una sequenza segnale della catena pesante umana ed una regione costante dell'IgG1 umana mostrato nella SEQ ID NO: 6 sono stati ligati utilizzando un kit di clonaggio per PCR In-Fusion Advantage (Clontech Laboratories, Inc.) per costruire un vettore di espressione pCMA-G1 della catena pesante di tipo IgG1 dell'anticorpo chimerico ed umanizzato avente una sequenza segnale, un sito di clonaggio, ed il gene della regione costante della catena pesante dell'IgG1 umana a valle del promotore del CMV.

5-2-3) Costruzione di un vettore di espressione della catena pesante dell'anticorpo cTINA1

Un frammento di DNA contenente il cDNA codificante per la regione variabile della catena pesante dell'anticorpo TINA1 è stato amplificato utilizzando il cDNA codificante per la regione variabile della catena pesante ottenuto nell'esempio 5-1-3) come stampo, KOD-Plus (Toyobo Co., Ltd.), ed una serie di inneschi descritta sotto, ed inserito in un sito scisso dall'enzima di restrizione BspI del vettore di espressione pCMA-G1 della catena pesante di tipo IgG1 chimerica ed umanizzata utilizzando un kit di clonaggio per PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) per costruire un vettore di espressione della catena pesante dell'anticorpo cTINA1. Il vettore di espressione ottenuto è stato indicato come "pCMA-G1/cTINA1". La sequenza nucleotidica della catena pesante dell'anticorpo cTINA1 viene mostrata nella SEQ ID NO: 7, e la sequenza amminoacidica codificata quindi viene mostrata nella SEQ ID NO: 8. La sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 7 e la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 8 vengono inoltre descritte nella figura 1.

Serie di inneschi per la catena pesante dell'anticorpo cTINA1

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

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

5-2-4) Costruzione di un vettore di espressione della catena leggera dell'anticorpo cTINA1

Un frammento di DNA contenente il cDNA codificante per la regione variabile della catena leggera dell'anticorpo TINA1 è stato amplificato utilizzando il cDNA codificante per la regione variabile della catena leggera

ottenuto nell'esempio 5-1-4) come stampo, KOD-Plus (Toyobo Co., Ltd.), ed una serie di inneschi descritti sotto, ed inserito in un sito scisso dall'enzima di restrizione BsiWI del vettore di espressione per tutti gli usi pCMA-LK della catena leggera dell'anticorpo chimerico ed umanizzato utilizzando un kit di clonaggio per PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) per costruire un vettore di espressione della catena leggera dell'anticorpo cTINA1. Il vettore di espressione ottenuto è stato indicato come "pCMA-LK/cTINA1". La sequenza nucleotidica della catena leggera dell'anticorpo cTINA1 viene mostrata nella SEQ ID NO: 9, e la sequenza amminoacidica codificata quindi viene mostrata nella SEQ ID NO: 10. La sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 9 e la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 10 vengono inoltre descritte nella figura 2.

Serie di inneschi per la catena leggera dell'anticorpo cTINA1

10 5'-ATCTCCGGCGCGTACGGCGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTC-3' (SEQ ID NO: 39: innesco TINA1L-F)

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

5-2-5) Produzione su piccola scala dell'anticorpo cTINA1

15 Cellule 293F FreeStyle (Invitrogen Corp.) sono state sottoposte a sottocoltura ed a coltura secondo il manuale.

1×10⁷ cellule 293F FreeStyle (Invitrogen Corp.) nella fase di crescita logaritmica sono state diluite con un terreno di espressione per 293 FreeStyle (Invitrogen Corp.) a 9,6 ml, quindi seminate in una bottiglia di immagazzinamento quadrata da 30 ml (Nalgene/Thermo Fisher Scientific, Inc.), e quindi sottoposte a coltura con agitazione a 90 giri/min per 1 ora in un incubatore con CO₂ all'8% a 37°C. Polietilenimmina (Polyscience #24765; 30 µg) è stata disciolta in Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 200 µl). Quindi, il vettore di espressione della catena leggera (6 µg) ed il vettore di espressione della catena pesante (4 µg) preparati utilizzando il kit per plasmidi PureLink HiPure (Invitrogen Corp.) sono stati aggiunti ad Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 200 µl). La soluzione miscelata di vettore di espressione/Opti-Pro SFM (200 µl) è stata aggiunta alla soluzione miscelata di polietilenimmina/Opti-Pro SFM (200 µl) e la miscela è stata agitata delicatamente, lasciata ulteriormente per 5 minuti, e quindi aggiunta alle cellule 293F FreeStyle. Un surnatante della coltura ottenuto mediante coltura con agitazione a 90 giri/min per 7 giorni in un incubatore con CO₂ all'8% a 37°C è stato

filtrato attraverso un filtro Minisart-Plus (Sartorius AG) ed utilizzato come campione per la valutazione.

L'anticorpo chimerico umano TINA1 ottenuto mediante la combinazione di pCMA-G1/cTINA1 e pCMA-LK/cTINA1 è stato indicato come "anticorpo cTINA1".

[Esempio 6: progettazione dell'anticorpo umanizzato dell'anticorpo monoclonale anti-TROP2 di topo]

5 6-1) Progettazione della versione umanizzata di TINA1

6-1-1) Modellizzazione molecolare della regione variabile di TINA1

La modellazione molecolare delle regioni variabili di TINA1 è stata realizzata mediante un metodo noto nell'arte come modellamento per omologia (Methods in Enzymology, 203, da 121 a 153 (1991)). Le regioni variabili di TINA1 determinate sopra sono state confrontate con le sequenze primarie (sono disponibili strutture tridimensionali derivate da strutture cristalline ai raggi X) delle regioni variabili immunoglobuliniche umane registrate in Protein Data Bank (Nuc. Acid Res. 35, da D301 a D303 (2007)). Di conseguenza, 1ZEA è stato scelto come uno avente la massima omologia di sequenza con la regione variabile della catena pesante di TINA1 tra anticorpi aventi in modo simile una delezione nelle loro regioni cornice. Inoltre, 3IU4 è stato scelto come uno avente la massima omologia di sequenza con la regione variabile della catena leggera di TINA1. Le strutture tridimensionali delle regioni cornice sono state preparate come "modello di cornice" combinando le coordinate di 1ZEA e di 3IU4 corrispondenti alla catena pesante ed alla catena leggera di TINA1. Successivamente, la tipica conformazione di ciascuna CDR è stata incorporata nel modello di cornice.

Infine, il calcolo dell'energia per escludere un contatto interatomico svantaggioso è stato condotto allo scopo di ottenere possibili modelli molecolari delle regioni variabili di TINA1 in termini energetici. Queste procedure sono state eseguite utilizzando un programma di predizione della struttura tridimensionale delle proteine disponibile in commercio Discovery Studio (Accelrys, Inc.).

6-1-2) Progettazione della sequenza amminoacidica per TINA1 umanizzato

L'anticorpo TINA1 umanizzato è stato costruito mediante un metodo noto nell'arte come innesto di CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, da 10029 a 10033 (1989)). Un anticorpo accettore è stato scelto sulla base dell'omologia degli amminoacidi nelle regioni cornice. Le sequenze delle regioni cornice di TINA1 sono state confrontate con le sequenze di tutte le cornici umane registrate nella banca dati di Kabat (Nuc. Acid Res., 29, da 205 a 206 (2001)) delle sequenze

amminoacidiche anticorpali. Di conseguenza, un anticorpo HuPRIA3 è stato scelto come accettore a causa della sua omologia di sequenza del 74% riguardo alle regioni cornice. I residui amminoacidici delle regioni cornice in HuPRIA3 sono stati allineati con i residui amminoacidici delle regioni cornice di TINA1 per identificare le posizioni di amminoacidi che non si sono appaiate tra questi. Le posizioni di questi residui sono state analizzate utilizzando il modello

5 tridimensionale di TINA1 costruito sopra. Quindi, i residui del donatore da innestare sull'accettore sono stati scelti secondo i criteri forniti da Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, da 10029 a 10033 (1989)). Alcuni residui del donatore così scelti sono stati trasferiti all'anticorpo accettore per costruire la sequenza umanizzata di TINA1 come descritta negli esempi sotto.

6-2) Umanizzazione della catena pesante di TINA1

10 6-2-1) Catena pesante tipo hTINA1-H1:

una catena pesante umanizzata di TINA1 progettata considerando la sostituzione della posizione amminoacidica 21 (isoleucina) con valina, della posizione amminoacidica 28 (prolina) con alanina, della posizione amminoacidica 30 (leucina) con valina, della posizione amminoacidica 35 (acido glutammico) con alanina, della posizione amminoacidica 36 (reonina) con serina, della posizione amminoacidica 38 (arginina) con lisina, della posizione amminoacidica 39

15 (isoleucina) con valina, della posizione amminoacidica 57 (glutammina) con arginina, della posizione amminoacidica 58 (lisina) con glutammina, della posizione amminoacidica 59 (metionina) con alanina, della posizione amminoacidica 62 (lisina) con glutammina, della posizione amminoacidica 65 (lisina) con acido glutammico, della posizione amminoacidica 67 (isoleucina) con metionina, della posizione amminoacidica 87 (fenilalanina) con valina, della posizione amminoacidica 88 (alanina) con reonina, della posizione amminoacidica 89 (fenilalanina) con isoleucina, della posizione amminoacidica

20 91 (leucina) con alanina, della posizione amminoacidica 92 (acido glutammico) con acido aspartico, della posizione amminoacidica 95 (alanina) con reonina, della posizione amminoacidica 102 (isoleucina) con leucina, della posizione amminoacidica 104 (asparagina) con serina, della posizione amminoacidica 107 (asparagina) con serina, della posizione amminoacidica 111 (reonina) con alanina, della posizione amminoacidica 112 (reonina) con valina, della posizione amminoacidica 114 (fenilalanina) con tirosina, della posizione amminoacidica 132 (alanina) con glutammina, e della

25 posizione amminoacidica 135 (alanina) con leucina quanto alla catena pesante di TINA1 mostrata nella SEQ ID NO: 8

dell'elenco delle sequenze è stata indicata come "catena pesante tipo hTINA1-H1".

La sequenza amminoacidica della catena pesante tipo hTINA1-H1 viene descritta nella SEQ ID NO: 12 dell'elenco delle sequenze. Una sequenza composta dai residui amminoacidici da 1 a 19, una sequenza composta dai residui amminoacidici da 20 a 140, ed una sequenza composta dai residui amminoacidici da 141 a 470 nella sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 12 corrispondono alla sequenza segnale, alla regione variabile della catena pesante, ed alla regione costante della catena pesante, rispettivamente. La sequenza nucleotidica codificante per la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 12 viene descritta nella SEQ ID NO: 11 dell'elenco delle sequenze. Una sequenza composta dai nucleotidi da 1 a 57, una sequenza composta dai nucleotidi da 58 a 420, ed una sequenza composta dai nucleotidi da 421 a 1410 nella sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 11 codificano per la sequenza segnale, per la sequenza della regione variabile della catena pesante, e per la sequenza della regione costante della catena pesante, rispettivamente. La sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 11 e la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 12 vengono inoltre descritte nella figura 3.

6-2-2) Catena pesante tipo hTINA1-H2:

una catena pesante umanizzata di TINA1 progettata considerando la sostituzione della posizione amminoacidica 21 (isoleucina) con valina, della posizione amminoacidica 28 (prolina) con alanina, della posizione amminoacidica 30 (leucina) con valina, della posizione amminoacidica 35 (acido glutammico) con alanina, della posizione amminoacidica 36 (treonina) con serina, della posizione amminoacidica 38 (arginina) con lisina, della posizione amminoacidica 39 (isoleucina) con valina, della posizione amminoacidica 57 (glutammina) con arginina, della posizione amminoacidica 58 (lisina) con glutammina, della posizione amminoacidica 59 (metionina) con alanina, della posizione amminoacidica 62 (lisina) con glutammina, della posizione amminoacidica 65 (lisina) con acido glutammico, della posizione amminoacidica 67 (isoleucina) con metionina, della posizione amminoacidica 87 (fenilalanina) con valina, della posizione amminoacidica 88 (alanina) con treonina, della posizione amminoacidica 89 (fenilalanina) con isoleucina, della posizione amminoacidica 92 (acido glutammico) con acido aspartico, della posizione amminoacidica 95 (alanina) con treonina, della posizione amminoacidica 102 (isoleucina) con leucina, della posizione amminoacidica 104 (asparagina) con serina, della posizione amminoacidica 107 (asparagina) con serina, della posizione amminoacidica 111 (treonina) con alanina, della posizione

amminoacidica 112 (treonina) con valina, della posizione amminoacidica 114 (fenilalanina) con tirosina, della posizione amminoacidica 132 (alanina) con glutammina, e della posizione amminoacidica 135 (alanina) con leucina quanto alla catena pesante di TINA1 mostrata nella SEQ ID NO: 8 dell'elenco delle sequenze è stata indicata come "catena pesante tipo hTINA1-H2".

5 La sequenza amminoacidica della catena pesante tipo hTINA1-H2 viene descritta nella SEQ ID NO: 14 dell'elenco delle sequenze. Una sequenza composta dai residui amminoacidici da 1 a 19, una sequenza composta dai residui amminoacidici da 20 a 140, ed una sequenza composta dai residui amminoacidici da 141 a 470 nella sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 14 corrispondono alla sequenza segnale, alla regione variabile della catena pesante, ed alla regione costante della catena pesante, rispettivamente. La sequenza nucleotidica codificante per la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 14 viene descritta nella SEQ ID NO: 13 dell'elenco delle sequenze. Una sequenza
10 composta dai nucleotidi da 1 a 57, una sequenza composta dai nucleotidi da 58 a 420, ed una sequenza composta dai nucleotidi da 421 a 1410 nella sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 13 codificano per la sequenza segnale, per la sequenza della regione variabile della catena pesante, e per la sequenza della regione costante della catena pesante, rispettivamente. La sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 13 e la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 14
15 vengono inoltre descritte nella figura 4.

6-2-3) Catena pesante tipo hTINA1-H3:

una catena pesante umanizzata di TINA1 progettata considerando la sostituzione della posizione amminoacidica 28 (prolina) con alanina, della posizione amminoacidica 30 (leucina) con valina, della posizione amminoacidica 36 (treonina) con serina, della posizione amminoacidica 38 (arginina) con lisina, della posizione amminoacidica 39 (isoleucina) con valina, della posizione amminoacidica 58 (lisina) con glutammina, della posizione amminoacidica 65 (lisina) con acido glutammico, della posizione amminoacidica 67 (isoleucina) con metionina, della posizione amminoacidica 87 (fenilalanina) con valina, della posizione amminoacidica 88 (alanina) con treonina, della posizione amminoacidica 92 (acido glutammico) con acido aspartico, della posizione amminoacidica 95 (alanina) con treonina, della posizione amminoacidica 102 (isoleucina) con leucina, della posizione amminoacidica 104 (asparagina) con serina,
25 della posizione amminoacidica 107 (asparagina) con serina, della posizione amminoacidica 111 (treonina) con alanina,

della posizione amminoacidica 112 (treonina) con valina, della posizione amminoacidica 114 (fenilalanina) con tirosina, della posizione amminoacidica 132 (alanina) con glutammina, e della posizione amminoacidica 135 (alanina) con leucina quanto alla catena pesante di TINA1 mostrata nella SEQ ID NO: 8 dell'elenco delle sequenze è stata indicata come "catena pesante tipo hTINA1-H3".

5 La sequenza amminoacidica della catena pesante tipo hTINA1-H3 viene descritta nella SEQ ID NO: 16 dell'elenco delle sequenze. Una sequenza composta dai residui amminoacidici da 1 a 19, una sequenza composta dai residui amminoacidici da 20 a 140, ed una sequenza composta dai residui amminoacidici da 141 a 470 nella sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 16 corrispondono alla sequenza segnale, alla regione variabile della catena pesante, ed alla regione costante della catena pesante, rispettivamente. La sequenza nucleotidica codificante per la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 16 viene descritta nella SEQ ID NO: 15 dell'elenco delle sequenze. Una sequenza
10 composta dai nucleotidi da 1 a 57, una sequenza composta dai nucleotidi da 58 a 420, ed una sequenza composta dai nucleotidi da 421 a 1410 nella sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 15 codificano per la sequenza segnale, per la sequenza della regione variabile della catena pesante, e per la sequenza della regione costante della catena pesante, rispettivamente. La sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 15 e la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 16
15 vengono inoltre descritte nella figura 5.

6-3) Umanizzazione della catena leggera di TINA1

6-3-1) Catena leggera tipo hTINA1-L1:

una catena leggera umanizzata di TINA1 progettata considerando la sostituzione della posizione amminoacidica 23 (valina) con glutammina, della posizione amminoacidica 28 (istidina) con prolina, della posizione amminoacidica 29
20 (lisina) con serina, della posizione amminoacidica 30 (fenilalanina) con serina, della posizione amminoacidica 31 (metionina) con leucina, della posizione amminoacidica 33 (treonina) con alanina, della posizione amminoacidica 40 (serina) con treonina, della posizione amminoacidica 62 (glutammina) con lisina, della posizione amminoacidica 63 (serina) con alanina, della posizione amminoacidica 80 (acido aspartico) con serina, della posizione amminoacidica 83 (treonina) con serina, della posizione amminoacidica 90 (alanina) con acido aspartico, della posizione amminoacidica 93
25 (fenilalanina) con leucina, della posizione amminoacidica 98 (valina) con leucina, della posizione amminoacidica 100

(alanina) con prolina, della posizione amminoacidica 103 (leucina) con fenilalanina, della posizione amminoacidica 120 (alanina) con glutammina, della posizione amminoacidica 126 (leucina) con isoleucina, e della posizione amminoacidica 129 (alanina) con treonina quanto alla catena leggera di TINA1 mostrata nella SEQ ID NO: 10 dell'elenco delle sequenze è stata indicata come "catena leggera tipo hTINA1-L1".

5 La sequenza amminoacidica della catena leggera tipo hTINA1-L1 viene descritta nella SEQ ID NO: 18 dell'elenco delle sequenze. Una sequenza composta dai residui amminoacidici da 1 a 20, una sequenza composta dai residui amminoacidici da 21 a 129, ed una sequenza composta dai residui amminoacidici da 130 a 234 nella sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 18 corrispondono alla sequenza segnale, alla regione variabile della catena leggera, ed alla regione costante della catena leggera, rispettivamente. La sequenza nucleotidica codificante per la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 18 viene descritta nella SEQ ID NO: 17 dell'elenco delle sequenze. Una sequenza
10 composta dai nucleotidi da 1 a 60, una sequenza composta dai nucleotidi da 61 a 387, ed una sequenza composta dai nucleotidi da 388 a 702 nella sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 17 codificano per la sequenza segnale, per la sequenza della regione variabile della catena leggera, e per la sequenza della regione costante della catena leggera, rispettivamente. La sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 17 e la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 18
15 vengono inoltre descritte nella figura 6.

6-3-2) Catena leggera tipo hTINA1-L2:

una catena leggera umanizzata di TINA1 progettata considerando la sostituzione della posizione amminoacidica 28 (istidina) con prolina, della posizione amminoacidica 29 (lisina) con serina, della posizione amminoacidica 30 (fenilalanina) con serina, della posizione amminoacidica 31 (metionina) con leucina, della posizione amminoacidica 33
20 (treonina) con alanina, della posizione amminoacidica 40 (serina) con treonina, della posizione amminoacidica 62 (glutammina) con lisina, della posizione amminoacidica 63 (serina) con alanina, della posizione amminoacidica 80 (acido aspartico) con serina, della posizione amminoacidica 83 (treonina) con serina, della posizione amminoacidica 90 (alanina) con acido aspartico, della posizione amminoacidica 93 (fenilalanina) con leucina, della posizione amminoacidica 98 (valina) con leucina, della posizione amminoacidica 100 (alanina) con prolina, della posizione amminoacidica 103
25 (leucina) con fenilalanina, della posizione amminoacidica 120 (alanina) con glutammina, della posizione amminoacidica

126 (leucina) con isoleucina, e della posizione amminoacidica 129 (alanina) con treonina quanto alla catena leggera di TINA1 mostrata nella SEQ ID NO: 10 dell'elenco delle sequenze è stata indicata come "catena leggera tipo hTINA1-L2".

5 La sequenza amminoacidica della catena leggera tipo hTINA1-L2 viene descritta nella SEQ ID NO: 20 dell'elenco delle sequenze. Una sequenza composta dai residui amminoacidici da 1 a 20, una sequenza composta dai residui amminoacidici da 21 a 129, ed una sequenza composta dai residui amminoacidici da 130 a 234 nella sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 20 corrispondono alla sequenza segnale, alla regione variabile della catena leggera, ed alla regione costante della catena leggera, rispettivamente. La sequenza nucleotidica codificante per la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 20 viene descritta nella SEQ ID NO: 19 dell'elenco delle sequenze. Una sequenza
10 composta dai nucleotidi da 1 a 60, una sequenza composta dai nucleotidi da 61 a 387, ed una sequenza composta dai nucleotidi da 388 a 702 nella sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 19 codificano per la sequenza segnale, per la sequenza della regione variabile della catena leggera, e per la sequenza della regione costante della catena leggera, rispettivamente. La sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 19 e la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 20 vengono inoltre descritte nella figura 7.

15 6-3-3) Catena leggera tipo hTINA1-L3:

una catena leggera umanizzata di TINA1 progettata considerando la sostituzione della posizione amminoacidica 28 (istidina) con prolina, della posizione amminoacidica 29 (lisina) con serina, della posizione amminoacidica 30 (fenilalanina) con serina, della posizione amminoacidica 31 (metionina) con leucina, della posizione amminoacidica 33 (treonina) con alanina, della posizione amminoacidica 40 (serina) con treonina, della posizione amminoacidica 62
20 (glutammina) con lisina, della posizione amminoacidica 63 (serina) con glutammina, della posizione amminoacidica 80 (acido aspartico) con serina, della posizione amminoacidica 83 (treonina) con serina, della posizione amminoacidica 90 (alanina) con acido aspartico, della posizione amminoacidica 93 (fenilalanina) con leucina, della posizione amminoacidica 98 (valina) con leucina, della posizione amminoacidica 100 (alanina) con prolina, della posizione amminoacidica 103 (leucina) con fenilalanina, della posizione amminoacidica 120 (alanina) con glutammina, della
25 posizione amminoacidica 126 (leucina) con isoleucina, e della posizione amminoacidica 129 (alanina) con treonina

quanto alla catena leggera di TINA1 mostrata nella SEQ ID NO: 10 dell'elenco delle sequenze è stata indicata come "catena leggera tipo hTINA1-L3".

La sequenza amminoacidica della catena leggera tipo hTINA1-L3 viene descritta nella SEQ ID NO: 22 dell'elenco delle sequenze. Una sequenza composta dai residui amminoacidici da 1 a 20, una sequenza composta dai residui amminoacidici da 21 a 129, ed una sequenza composta dai residui amminoacidici da 130 a 234 nella sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 22 corrispondono alla sequenza segnale, alla regione variabile della catena leggera, ed alla regione costante della catena leggera, rispettivamente. La sequenza nucleotidica codificante per la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 22 viene descritta nella SEQ ID NO: 21 dell'elenco delle sequenze. Una sequenza composta dai nucleotidi da 1 a 60, una sequenza composta dai nucleotidi da 61 a 387, ed una sequenza composta dai nucleotidi da 388 a 702 nella sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 21 codificano per la sequenza segnale, per la sequenza della regione variabile della catena leggera, e per la sequenza della regione costante della catena leggera, rispettivamente. La sequenza nucleotidica della SEQ ID NO: 21 e la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 22 vengono inoltre descritte nella figura 8.

[Esempio 7: costruzione di un vettore di espressione dell'anticorpo hTINA1 e produzione di un anticorpo]

7-1) Costruzione di un vettore di espressione della catena pesante di hTINA1

7-1-1) Costruzione di un vettore di espressione di hTINA1-H1

Un frammento di DNA contenente una sequenza di DNA codificante per la regione variabile di hTINA1-H1 mostrata nelle posizioni nucleotidiche da 36 a 437 della sequenza nucleotidica di hTINA1-H1 rappresentata dalla SEQ ID NO: 11 dell'elenco delle sequenze è stato sintetizzato (servizio di sintesi artificiale dei geni GeneArt). Un frammento di DNA contenente la sequenza di DNA codificante per la regione variabile di hTINA1-H1 è stato amplificato utilizzando il frammento sintetizzato di DNA come stampo, KOD-Plus (Toyobo Co., Ltd.), ed una serie di inneschi descritta sotto, ed inserito in un sito scisso dall'enzima di restrizione BspI del vettore di espressione pCMA-G1 della catena pesante di tipo IgG1 chimerica ed umanizzata utilizzando un kit di clonaggio per PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) per costruire un vettore di espressione di hTINA1-H1. Il vettore di espressione ottenuto è stato indicato come "pCMA-G1/hTINA1-H1".

Serie di inneschi

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

5'-gggcccttggtggaggctgagc-3' (SEQ ID NO: 42: innesco EG1-Inf-R)

7-1-2) Costruzione di un vettore di espressione di hTINA1-H2

5 Un frammento di DNA contenente una sequenza di DNA codificante per la regione variabile di hTINA1-H2 mostrata nelle posizioni nucleotidiche da 36 a 437 della sequenza nucleotidica di hTINA1-H2 rappresentata dalla SEQ ID NO: 13 dell'elenco delle sequenze è stato sintetizzato (servizio di sintesi artificiale dei geni GeneArt), ed un vettore di espressione di hTINA1-H2 è stato costruito nello stesso modo dell'esempio 7-1-1). Il vettore di espressione ottenuto è stato indicato come "pCMA-G1/hTINA1-H2".

10 7-1-3) Costruzione di un vettore di espressione di hTINA1-H3

15 Un frammento di DNA contenente una sequenza di DNA codificante per la regione variabile di hTINA1-H3 mostrata nelle posizioni nucleotidiche da 36 a 437 della sequenza nucleotidica di hTINA1-H3 rappresentata dalla SEQ ID NO: 15 dell'elenco delle sequenze è stato sintetizzato (servizio di sintesi artificiale dei geni GeneArt), ed un vettore di espressione di hTINA1-H3 è stato costruito nello stesso modo dell'esempio 7-1-1). Il vettore di espressione ottenuto è stato indicato come "pCMA-G1/hTINA1-H3".

7-2) Costruzione di un vettore di espressione della catena leggera di hTINA1

7-2-1) Costruzione di un vettore di espressione di hTINA1-L1

20 Un frammento di DNA contenente una sequenza di DNA codificante per la regione variabile di hTINA1-L1 mostrata nelle posizioni nucleotidiche da 38 a 402 della sequenza nucleotidica di hTINA1-L1 rappresentata dalla SEQ ID NO: 17 dell'elenco delle sequenze è stato sintetizzato (servizio di sintesi artificiale dei geni GeneArt). Un frammento di DNA contenente la sequenza di DNA codificante per la regione variabile di hTINA1-L1 è stato amplificato utilizzando il frammento sintetizzato di DNA come stampo, KOD-Plus (Toyobo Co., Ltd.), ed una serie di inneschi descritta sotto, ed inserito in un sito scisso dall'enzima di restrizione BsiWI del vettore di espressione pCMA-LK della catena leggera dell'anticorpo chimerico ed umanizzato utilizzando un kit di clonaggio per PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) per costruire un vettore di espressione di hTINA1-L1. Il vettore di espressione ottenuto è stato indicato come

25

“pCMA-LK/hTINA1-L1”.

Serie di inneschi

5'-ctgtggatctccggcgcgtacggc-3' (SEQ ID NO: 43: innesco CM-IKF)

5'-ggagggggcggccaccgtacg-3' (SEQ ID NO: 44: innesco KCL-Inf-R)

5 7-2-2) Costruzione di un vettore di espressione di hTINA1-L2

Un frammento di DNA contenente una sequenza di DNA codificante per la regione variabile di hTINA1-L2 mostrata nelle posizioni nucleotidiche da 38 a 402 della sequenza nucleotidica di hTINA1-L2 rappresentata dalla SEQ ID NO: 19 dell'elenco delle sequenze è stato sintetizzato (servizio di sintesi artificiale dei geni GeneArt), ed un vettore di espressione di hTINA1-L2 è stato costruito nello stesso modo dell'esempio 7-2-1). Il vettore di espressione ottenuto è stato indicato come “pCMA-LK/hTINA1-L2”.

10

7-2-3) Costruzione di un vettore di espressione di hTINA1-L3

Un frammento di DNA contenente una sequenza di DNA codificante per la regione variabile di hTINA1-L3 mostrata nelle posizioni nucleotidiche da 38 a 402 della sequenza nucleotidica di hTINA1-L3 rappresentata dalla SEQ ID NO: 21 dell'elenco delle sequenze è stato sintetizzato (servizio di sintesi artificiale dei geni GeneArt), ed un vettore di espressione di hTINA1-L3 è stato costruito nello stesso modo dell'esempio 7-2-1). Il vettore di espressione ottenuto è stato indicato come “pCMA-LK/hTINA1-L3”.

15

7-3) Produzione e purificazione dell'anticorpo hTINA1

7-3-1) Produzione su piccola scala dell'anticorpo hTINA1

Ciascun anticorpo è stato prodotto nello stesso modo dell'esempio 5-2-5).

20

L'anticorpo hTINA1 ottenuto mediante la combinazione di pCMA-G1/hTINA1-H1 e pCMA-LK/hTINA1-L1 è stato indicato come “hTINA1-H1L1”; l'anticorpo hTINA1 ottenuto mediante la combinazione di pCMA-G1/hTINA1-H2 e pCMA-LK/hTINA1-L1 è stato indicato come “hTINA1-H2L1”; l'anticorpo hTINA1 ottenuto mediante la combinazione di pCMA-G1/hTINA1-H2 e pCMA-LK/hTINA1-L2 è stato indicato come “hTINA1-H2L2”; e l'anticorpo hTINA1 ottenuto mediante la combinazione di pCMA-G1/hTINA1-H3 e pCMA-LK/hTINA1-L3 è stato indicato come “hTINA1-H3L3”.

25

7-3-2) Produzione dell'anticorpo hTINA1

hTINA1-H1L1, hTINA1-H2L1, hTINA1-H2L2, ed hTINA1-H3L3 sono stati prodotti mediante il seguente metodo.

5 Cellule 293F FreeStyle (Invitrogen Corp.) sono state sottoposte a sottocoltura ed a coltura secondo il manuale.
1,2×10⁹ cellule 293F FreeStyle (Invitrogen Corp.) nella fase di crescita logaritmica sono state seminate in un pallone di Erlenmeyer Fernbach da 3 l (Corning Inc.), quindi diluite con un terreno di espressione per 293 FreeStyle (Invitrogen Corp.) ad 1,0×10⁶ cellule/ml, e quindi sottoposte a coltura con agitazione a 90 giri/min per 1 ora in un incubatore con CO₂ all'8% a 37°C. Polietilenimmina (Polyscience #24765; 3,6 mg) è stata disciolta in Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 20 ml). Quindi, il vettore di espressione della catena leggera (0,8 mg) ed il vettore di espressione della catena pesante (0,4
10 mg) preparati utilizzando il kit per plasmidi PureLink HiPure (Invitrogen Corp.) sono stati aggiunti ad Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 20 ml). La soluzione miscelata di vettore di espressione/Opti-Pro SFM (20 ml) è stata aggiunta alla soluzione miscelata di polietilenimmina/Opti-Pro SFM (20 ml) e la miscela è stata agitata delicatamente, lasciata ulteriormente per 5 minuti, e quindi aggiunta alle cellule 293F FreeStyle. Un surnatante della coltura ottenuto mediante coltura con agitazione a 90 giri/min per 7 giorni in un incubatore con CO₂ all'8% a 37°C è stato filtrato attraverso un
15 filtro a capsula monouso (ADVANTEC #CCS-045-E1H).

7-3-3) Purificazione dell'anticorpo hTINA1

Ciascun anticorpo è stato purificato dal surnatante della coltura ottenuto in 7-3-2) sopra mediante due passaggi utilizzando la cromatografia di affinità con rProteina A (da 4°C a 6°C) e l'idrossiapatite ceramica (temperatura ambiente). I passaggi di sostituzione del tampone dopo la purificazione mediante cromatografia di affinità con rProteina A e dopo la
20 purificazione mediante idrossiapatite ceramica sono stati condotti da 4°C a 6°C. Innanzitutto, il surnatante della coltura è stato applicato a MabSelect SuRe (prodotto da GE Healthcare Japan Corporation, colonna HiTrap) equilibrata con PBS. Dopo l'ingresso dell'intero surnatante della coltura nella colonna, la colonna è stata lavata con PBS in una quantità di almeno due volte il volume di colonna. In seguito, frazioni contenenti l'anticorpo sono state raccolte mediante eluizione con soluzione di cloridrato di arginina 2M (pH 4,0). Le frazioni hanno subito una sostituzione di tampone con PBS
25 mediante dialisi (Thermo Fisher Scientific, Inc., cassetta per dialisi Slide-A-Lyzer) e quindi sono state diluite 5 volte con

un tampone di fosfato di sodio 5mM e MES 50mM (pH 7,0). La soluzione di anticorpo risultante è stata posta su una colonna di idrossiapatite ceramica (Bio-Rad Laboratories, Inc., colonna di idrossiapatite Bio-Scale CHT tipo I) equilibrata con un tampone di NaPi 5mM, MES 50mM, ed NaCl 30mM (pH 7,0). Le frazioni contenenti l'anticorpo sono state raccolte mediante eluizione in gradiente di concentrazione lineare utilizzando cloruro di sodio. Le frazioni hanno subito una sostituzione di tampone con HBSor (istidina 25mM/sorbitolo al 5%, pH 6,0) mediante dialisi (Thermo Fisher Scientific, Inc., cassetta per dialisi Slide-A-Lyzer). Infine, le frazioni sono state concentrate e regolate ad una concentrazione di IgG di 20 mg/ml o superiore utilizzando un dispositivo a filtro per centrifuga UF VIVASPIN 20 (limite di peso molecolare: UF10K, Sartorius AG, 4°C), ed utilizzate come campione purificato.

[Esempio di riferimento 1: produzione di un vettore di espressione dell'anticorpo hRS7 e produzione di un anticorpo]

L'anticorpo hRS7 è stato prodotto sulla base delle sequenze amminoacidiche di una catena leggera e di una catena pesante descritte nella pubblicazione internazionale WO 2003/074566.

1-1) Costruzione di un vettore di espressione della catena pesante dell'anticorpo hRS7

Un frammento di DNA contenente una sequenza di DNA codificante per la regione variabile della catena pesante dell'anticorpo hRS7 mostrata nelle posizioni nucleotidiche da 36 a 437 della sequenza nucleotidica della catena pesante dell'anticorpo hRS7 rappresentata dalla SEQ ID NO: 29 dell'elenco delle sequenze è stato sintetizzato (servizio di sintesi artificiale dei geni GeneArt), ed un vettore di espressione della catena pesante dell'anticorpo hRS7 è stato costruito nello stesso modo dell'esempio 7-1-1). Il vettore di espressione ottenuto è stato indicato come "pCMA-G1/hRS7". La sequenza amminoacidica della catena pesante dell'anticorpo hRS7 viene mostrata nella SEQ ID NO: 30 dell'elenco delle sequenze.

1-2) Costruzione di un vettore di espressione della catena leggera dell'anticorpo hRS7

Un frammento di DNA contenente una sequenza di DNA codificante per la regione variabile della catena leggera dell'anticorpo hRS7 mostrata nelle posizioni nucleotidiche da 38 a 402 della sequenza nucleotidica della catena leggera dell'anticorpo hRS7 rappresentata dalla SEQ ID NO: 31 dell'elenco delle sequenze è stato sintetizzato (servizio di sintesi artificiale dei geni GeneArt), ed un vettore di espressione della catena leggera dell'anticorpo hRS7 è stato costruito nello stesso modo dell'esempio 7-2-1). Il vettore di espressione ottenuto è stato indicato come "pCMA-LK/hRS7". La sequenza amminoacidica della catena pesante dell'anticorpo hRS7 viene mostrata nella SEQ ID NO: 32 dell'elenco delle sequenze.

1-3) Produzione e purificazione dell'anticorpo hRS7

1-3-1) Produzione dell'anticorpo hRS7

L'anticorpo hRS7 è stato prodotto nello stesso modo dell'esempio 7-3-2) mediante la combinazione di pCMA-G1/hRS7 e pCMA-LK/hRS7.

5 1-3-2) Purificazione dell'anticorpo hRS7

L'anticorpo è stato purificato dal surnatante della coltura ottenuto in 1-3-1) nello stesso modo dell'esempio 7-3-3).

[Esempio 8: misurazione dell'affinità di legame per l'antigene dell'anticorpo hTINA1 e dell'anticorpo hRS7]

10 8-1) Misurazione dell'affinità di legame per l'antigene utilizzando un anticorpo (surnatante della coltura) prodotto su piccola scala

Ciascun anticorpo è stato testato per la sua costante di dissociazione per un antigene (chimera umana ricombinante TROP-2/Fc) utilizzando Biacore 3000 (GE Healthcare Japan Corporation) mediante il metodo di cattura dell'anticorpo come ligando su un anticorpo anti-IgG umana (Fab) immobilizzato e saggiando l'antigene come un analita. Circa 2.000 RU di anticorpo anti-IgG umana (Fab) (kit per la cattura di Fab umano, GE Healthcare Japan Corporation) sono state legate covalentemente ad un chip sensore CM5 (BIAcore, Inc.) mediante il metodo di accoppiamento dell'ammina. In modo simile, questo anticorpo è stato immobilizzato su una cella a flusso di riferimento. Il tampone di corsa utilizzato è stato HBS-EP+ (HEPES 10mM pH 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, tensioattivo P20 allo 0,05%). Il surnatante della coltura contenente l'anticorpo è stato aggiunto per 80 secondi sul chip sul quale è stato immobilizzato l'anticorpo anti-IgG umana (Fab), e quindi, diluizioni seriali (da 1nM a 1000nM) dell'antigene vi sono state ciascuna aggiunta ad una velocità di flusso di 30 μ l/min per 300 secondi. Successivamente, la fase di dissociazione è stata monitorata per 600 secondi. Gly-HCl 10mM (pH 1,5) contenente DMSO al 20% vi è stato aggiunto come soluzione rigenerante ad una velocità di flusso di 10 μ l/min per 60 secondi. I dati sono stati analizzati utilizzando il modello di legame bivalente di un programma analitico (programma BIAevaluation, versione 4.1) per calcolare una costante di velocità di associazione k_{on} , una costante di velocità di dissociazione k_{off} , ed una costante di dissociazione (KD; KD= k_{off}/k_{on}).

[Tabella 1]

	nome	KD (M)
1	hTINA1-H1L1	6,3E-08
2	hTINA1-H2L1	6,9E-08
3	hTINA1-H2L2	7,1E-08
4	hTINA1-H3L3	5,8E-08
5	cTINA1	5,6E-08

Attività di legame utilizzando il surnatante della coltura come campione di anticorpo

8-2) Misurazione dell'affinità di legame per l'antigene utilizzando un anticorpo purificato

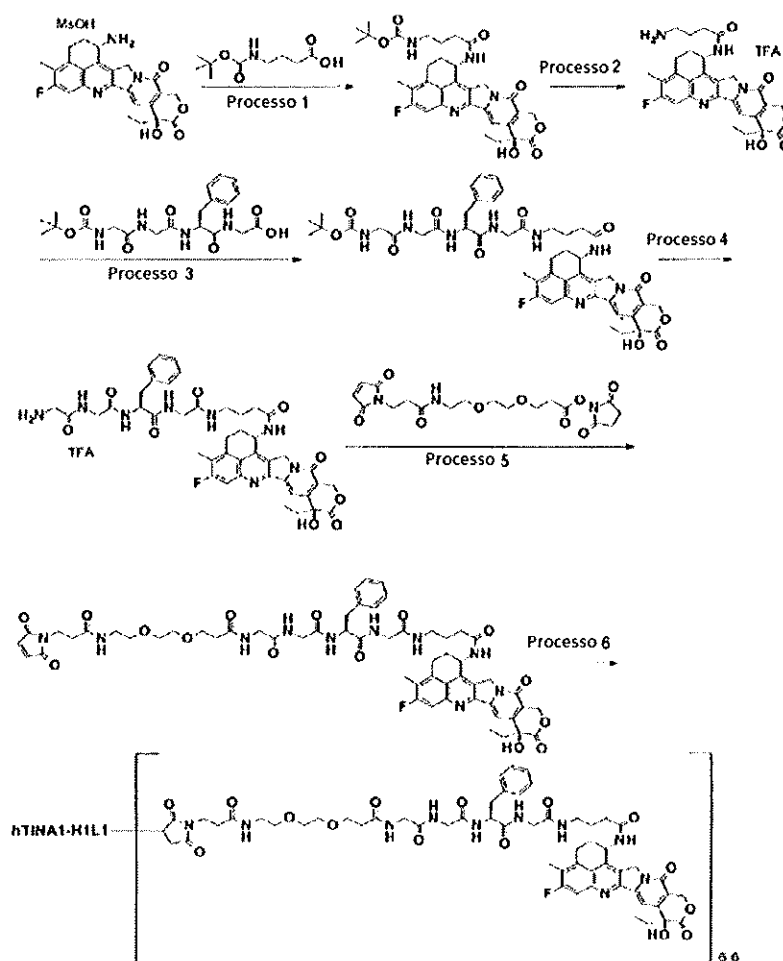
Ciascun anticorpo è stato testato per la sua costante di dissociazione per un antigene (chimera umana ricombinante TROP-2/Fc) utilizzando Biacore 3000 (GE Healthcare Japan Corporation) mediante il metodo di cattura dell'anticorpo come ligando su un anticorpo anti-IgG umana (Fab) immobilizzato e saggiando l'antigene come un analita. Circa 2.000 RU di anticorpo anti-IgG umana (Fab) (kit per la cattura di Fab umano, GE Healthcare Japan Corporation) sono state legate covalentemente ad un chip sensore CM5 (Biacore, Inc.) mediante il metodo di accoppiamento dell'ammina. In modo simile, questo anticorpo è stato immobilizzato su una cella a flusso di riferimento. Il tampone di corsa utilizzato è stato HBS-EP+ (HEPES 10mM pH 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, tensioattivo P20 allo 0,05%). L'anticorpo è stato aggiunto per 1 min sul chip sul quale è stato immobilizzato l'anticorpo anti-IgG umana (Fab), e quindi, diluizioni seriali (da 1nM a 1000nM) dell'antigene vi sono state ciascuna aggiunta ad una velocità di flusso di 30 µl/min per 300 secondi. Successivamente, la fase di dissociazione è stata monitorata per 600 secondi. NaOH 25mM diluito con un tampone di corsa vi è stato aggiunto due volte come soluzione rigenerante ad una velocità di flusso di 100 µl/min per 3 secondi. I dati sono stati analizzati nello stesso modo come sopra.

[Tabella 2]

	nome	KD (M)
1	hTINA1-H1L1	2,7E-08
2	hTINA1-H2L1	3,0E-08
3	hTINA1-H2L2	2,7E-08
4	hTINA1-H3L3	1,5E-08
5	hRS7	3,0E-10

Misurazione dell'attività di legame utilizzando un anticorpo purificato come campione di anticorpo
 [Esempio 9: produzione di un ADC con hTINA1-H1L1 (1)]

[Formula 25]



Procedimento 1: tert-butil (4-{{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]ammino}-4-ossobutil)carbammato

5 Acido 4-(tert-butossicarbonilammino)butanoico (0,237 g, 1,13 mmol) è stato disciolto in diclorometano (10 ml), sono stati aggiunti N-idrossisuccinimide (0,130 g, 1,13 mmol) ed 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide cloridrato (0,216 g, 1,13 mmol), ed agitati per 1 ora. La soluzione di reazione è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di N,N-dimetilformammide (10 ml) caricata con exatecano mesilato (0,500 g, 0,94 mmol) e trietilammina (0,157 ml, 1,13 mmol), ed agitata a temperatura ambiente per 1 giorno. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta ed il residuo ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice [cloroformio-cloroformio:metanolo=8:2 (v/v)] a dare il composto del titolo (0,595 g, quantitativa).

10 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,31 (9H, s), 1,58 (1H, t, J=7,2 Hz), 1,66 (2H, t, J=7,2 Hz), 1,89-1,82 (2H, m), 2,12-2,21 (3H, m), 2,39 (3H, s), 2,92 (2H, t, J=6,5 Hz), 3,17 (2H, s), 5,16 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,24 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,59-5,55 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,78 (1H, t, J=6,3 Hz), 7,30 (1H, s), 7,79 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,40 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (APCI) m/z: 621 (M+H)⁺.

15 Procedimento 2: 4-ammino-N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]butanamamide trifluoroacetato

Il composto (0,388 g, 0,61 mmol) ottenuto nel procedimento 1 sopra è stato disciolto in diclorometano (9 ml). Acido trifluoroacetico (9 ml) è stato aggiunto ed è stato agitato per 4 ore. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta ed i residui ottenuti sono stati purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice [cloroformio-strato organico ripartito di cloroformio:metanolo:acqua=7:3:1 (v/v/v)] a dare il composto del titolo (0,343 g, quantitativa).

20 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,79-1,92 (4H, m), 2,10-2,17 (2H, m), 2,27 (2H, t, J=7,0 Hz), 2,40 (3H, s), 2,80-2,86 (2H, m), 3,15-3,20 (2H, m), 5,15 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,26 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,54-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,32 (1H, s), 7,72 (3H, s largo), 7,82 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,54 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (APCI) m/z: 521 (M+H)⁺.

25 Procedimento 3: N-(tert-butossicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-{{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-

diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]ammino}-4-ossobutil)glicinammide

N-(tert-butossicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanilglicina (0,081 g, 0,19 mmol) è stata disciolta in diclorometano (3 ml), N-idrossisuccinimmide (0,021 g, 0,19 mol) ed 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide cloridrato (0,036 g, 0,19 mmol) sono stati aggiunti e quindi agitati per 3,5 ore. La soluzione di reazione è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di N,N-dimetilformammide (1,5 ml) caricata con il composto (0,080 g, 0,15 mmol) ottenuto nel procedimento 2 sopra, ed agitata a temperatura ambiente per 4 ore. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta ed i residui ottenuti sono stati purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice [cloroformio-cloroformio:metanolo=8:2 (v/v)] a dare il composto del titolo (0,106 g, 73%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,36 (9H, s), 1,71 (2H, m), 1,86 (2H, t, J=7,8 Hz), 2,15-2,19 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,77 (1H, dd, J=12,7, 8,8 Hz), 3,02 (1H, dd, J=14,1, 4,7 Hz), 3,08-3,11 (2H, m), 3,16-3,19 (2H, m), 3,54 (2H, d, J=5,9 Hz), 3,57-3,77 (4H, m), 4,46-4,48 (1H, m), 5,16 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,55-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 7,00 (1H, t, J=6,3 Hz), 7,17-7,26 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,71 (1H, t, J=5,7 Hz), 7,80 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,92 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,15 (1H, d, J=8,2 Hz), 8,27 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,46 (1H, d, J=8,2 Hz).

MS (APCI) m/z: 939 (M+H)⁺.

Procedimento 4: glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-{{(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]ammino}-4-ossobutil)glicinammide trifluoroacetato

Il composto (1,97 g, 2,10 mmol) ottenuto nel procedimento 3 sopra è stato disciolto in diclorometano (7 ml). Dopo aver aggiunto acido trifluoroacetico (7 ml), è stato agitato per 1 ora. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta, ed è stato caricato con toluene per la distillazione azeotropica. I residui ottenuti sono stati purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice [cloroformio-strato organico ripartito di cloroformio:metanolo:acqua=7:3:1 (v/v/v)] a dare il composto del titolo (1,97 g, 99%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,71-1,73 (2H, m), 1,82-1,90 (2H, m), 2,12-2,20 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,75 (1H, dd, J=13,7, 9,4 Hz), 3,03-3,09 (3H, m), 3,18-3,19 (2H, m), 3,58-3,60 (2H, m), 3,64 (1H, d, J=5,9 Hz),

3,69 (1H, d, J=5,9 Hz), 3,72 (1H, d, J=5,5 Hz), 3,87 (1H, dd, J=16,8, 5,9 Hz), 4,50-4,56 (1H, m), 5,16 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,55-5,60 (1H, m), 7,17-7,27 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,78-7,81 (2H, m), 7,95-7,97 (3H, m), 8,33-8,35 (2H, m), 8,48-8,51 (2H, m).

MS (APCI) m/z: 839 (M+H)⁺.

5 Procedimento 5: N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)propanoil]ammino}etossi)etossi]propanoil}glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-{{(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]ammino}-4-ossobutil)glicinammide

10 Ad una soluzione di N,N-dimetilformammide (1,20 ml) del composto (100 mg, 0,119 mmol) ottenuto nel procedimento 4 sopra, diisopropiletilammina (20,8 µl, 0,119 mmol) ed N-succinimidil 3-(2-(2-(3-maleinimidopropanammido)etossi)etossi)propanoato (50,7 mg, 0,119 mmol) sono stati aggiunti ed agitati a temperatura ambiente per 1 ora. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta ed i residui ottenuti sono stati purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice [cloroformio-cloroformio:metanolo=5:1 (v/v)] a dare il composto del titolo come solido giallo chiaro (66,5 mg, 48%).

15 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,85 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,65-1,74 (2H, m), 1,77-1,90 (2H, m), 2,07-2,19 (4H, m), 2,30 (2H, t, J=7,2 Hz), 2,33-2,36 (2H, m), 2,38 (3H, s), 2,76 (1H, dd, J=13,7, 9,8 Hz), 2,96-3,18 (9H, m), 3,42-3,44 (4H, m), 3,53-3,76 (10H, m), 4,43 (1H, td, J=8,6, 4,7 Hz), 5,14 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,23 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,38 (1H, d, J=17,2 Hz), 5,42 (1H, d, J=17,2 Hz), 5,52-5,58 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,98 (2H, s), 7,12-7,17 (1H, m), 7,18-7,25 (4H, m), 7,29 (1H, s), 7,69 (1H, t, J=5,5 Hz), 7,78 (1H, d, J=11,3 Hz), 7,98-8,03 (2H, m), 8,11 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,16 (1H, t, J=5,7 Hz),
20 8,23 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,44 (1H, d, J=9,0 Hz).

MS (APCI) m/z: 1149 (M+H)⁺.

Procedimento 6: coniugato anticorpo-farmaco (1)

25 Riduzione dell'anticorpo: l'hTINA1-H1L1 prodotto nell'esempio 7 è stato preparato per avere una concentrazione dell'anticorpo di 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA utilizzando la procedura comune B (come coefficiente di assorbimento a 280 nm, è stato utilizzato 1,54) e la procedura comune C descritte nel metodo di produzione 1. La

soluzione (10,0 ml) è stata raccolta in una provetta da 50 ml e caricata con una soluzione acquosa di TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 ml; 4,6 equivalenti per molecola anticorpale) e con una soluzione acquosa di idrogenofosfato di dipotassio 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 ml). Dopo la conferma che la soluzione aveva un pH di $7,4 \pm 0,1$, il legame disolfuro alla parte cerniera nell'anticorpo è stato ridotto incubando a 37°C per 1 ora.

5 Coniugazione tra anticorpo e gruppo di collegamento del farmaco: dopo l'incubazione della soluzione di cui sopra per 10 minuti in un bagno d'acqua a temperatura ambiente, vi è stato aggiunto dimetilsolfossido (0,567 ml). Successivamente, una soluzione in dimetilsolfossido contenente 10mM del composto ottenuto nel procedimento 5 di cui sopra (0,635 ml; 9,2 equivalenti per molecola anticorpale) vi è stata aggiunta ed agitata utilizzando un dispositivo di rotazione per provette (MTR-103, prodotto da AS ONE Corporation) per coniugare il gruppo di collegamento del farmaco
10 all'anticorpo a temperatura ambiente per 40 minuti. In seguito, una soluzione acquosa (0,127 ml; 18,4 equivalenti per molecola anticorpale) di NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vi è stata aggiunta ed agitata per terminare la reazione del gruppo di collegamento del farmaco a temperatura ambiente per altri 20 minuti.

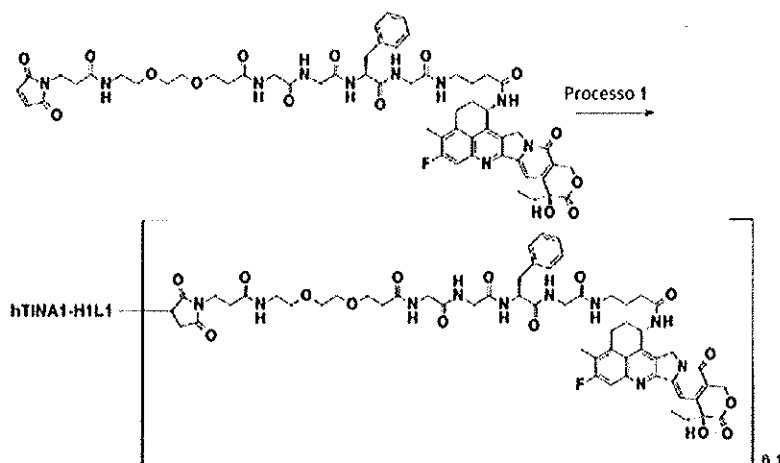
Purificazione: la soluzione di cui sopra è stata sottoposta a purificazione utilizzando la procedura comune D descritta nel metodo di produzione 1 a dare 35,0 ml di una soluzione contenente il coniugato anticorpo-farmaco del titolo.

15 Caratterizzazione chimico-fisica: utilizzando la procedura comune E descritta nel metodo di produzione 1 (sono stati utilizzati $\epsilon_{D,280}=4.964$ (valore medio misurato), ed $\epsilon_{D,370}=18.982$ (valore medio misurato)), sono stati ottenuti i seguenti valori caratteristici.

Concentrazione dell'anticorpo: 2,70 mg/ml, resa dell'anticorpo: 94,5 mg (95%), e numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune E: 6,6.

20 [Esempio 10: produzione di un ADC con hTINA1-H1L1 (2)]

[Formula 26]



Procedimento 1: coniugato anticorpo-farmaco (2)

5 Riduzione dell'anticorpo: l'hTINA1-H1L1 prodotto nell'esempio 7 è stato preparato per avere una concentrazione dell'anticorpo di 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA utilizzando la procedura comune B (come coefficiente di
 10 assorbimento a 280 nm, è stato utilizzato 1,54) e la procedura comune C descritte nel metodo di produzione 1. La soluzione (2,00 ml) è stata raccolta in una provetta da 4 ml e caricata con una soluzione acquosa di TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 ml; 5,0 equivalenti per molecola anticorpale) e con una soluzione acquosa di idrogenofosfato di dipotassio 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,100 ml). Dopo la conferma che la soluzione aveva un pH di
 15 7,4±0,1, il legame disolfuro alla parte cerniera nell'anticorpo è stato ridotto incubando a 37°C per 1 ora.

Coniugazione tra anticorpo e gruppo di collegamento del farmaco: dopo l'incubazione della soluzione di cui sopra per 10 minuti in un bagno d'acqua di 15°C, una soluzione in dimetilsolfossido (0,127 ml; 9,2 equivalenti per molecola anticorpale) contenente il composto 10mM ottenuto nel procedimento 5 dell'esempio 9 vi è stata aggiunta ed incubata per coniugare il gruppo di collegamento del farmaco all'anticorpo in un bagno d'acqua di 15°C per 1 ora. In
 15 seguito, una soluzione acquosa (0,0190 ml; 13,8 equivalenti per molecola anticorpale) di NAC 100mM (Sigma-Aldrich

Co. LLC) vi è stata aggiunta ed agitata utilizzando un dispositivo di rotazione per provette per terminare la reazione del gruppo di collegamento del farmaco a temperatura ambiente per 20 minuti.

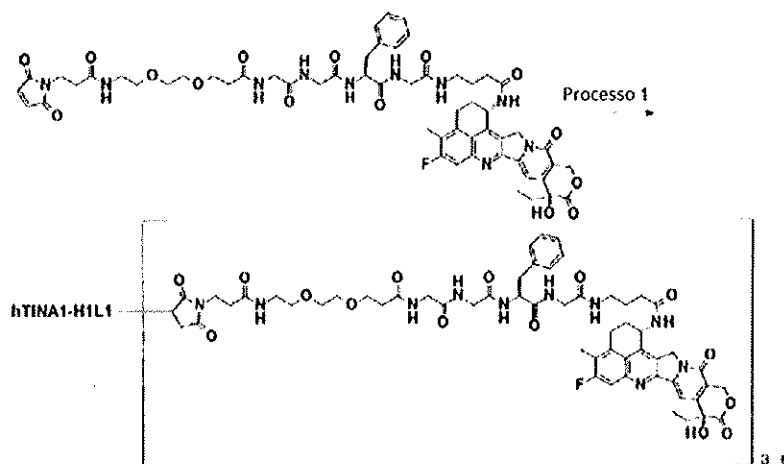
Purificazione: la soluzione di cui sopra è stata sottoposta a purificazione utilizzando la procedura comune D descritta nel metodo di produzione 1 a dare 9,00 ml di una soluzione contenente il coniugato anticorpo-farmaco del titolo.

5 Caratterizzazione chimico-fisica: utilizzando la procedura comune E descritta nel metodo di produzione 1 (sono stati utilizzati $\epsilon_{D,280}=4.964$ (valore medio misurato), ed $\epsilon_{D,370}=18.982$ (valore medio misurato)), sono stati ottenuti i seguenti valori caratteristici.

Concentrazione dell'anticorpo: 2,08 mg/ml, resa dell'anticorpo: 18,7 mg (94%), e numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune E: 6,1.

10 [Esempio 11: produzione di un ADC con hTINA1-H1L1 (3)]

[Formula 27]



Procedimento 1: coniugato anticorpo-farmaco (3)

Riduzione dell'anticorpo: l'hTINA1-H1L1 prodotto nell'esempio 7 è stato preparato per avere una

concentrazione dell'anticorpo di 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA utilizzando la procedura comune B (come coefficiente di assorbimento a 280 nm, è stato utilizzato 1,54) e la procedura comune C descritte nel metodo di produzione 1. La soluzione (5,0 ml) è stata raccolta in un contenitore da 15 ml, caricata con una soluzione acquosa di idrogenofosfato di dipotassio 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 ml) con agitazione, e quindi agitata a 37°C per 10 minuti. Dopo avervi
5 aggiunto una soluzione acquosa di TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0745 ml; 2,3 equivalenti per molecola anticorpale) con agitazione e confermando quindi che la soluzione aveva un pH di $7,0 \pm 0,1$, il legame disolfuro alla parte cerniera nell'anticorpo è stato ridotto agitando a 37°C per 1 ora.

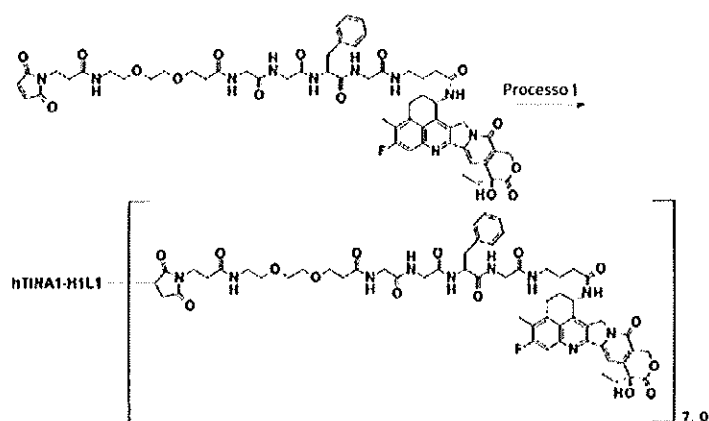
Coniugazione tra anticorpo e gruppo di collegamento del farmaco: dopo l'agitazione della soluzione di cui sopra per 10 minuti in un bagno d'acqua di 15°C, una soluzione in dimetilsolfossido (0,162 ml; 5,0 equivalenti per molecola anticorpale) contenente il composto 10mM ottenuto nel procedimento 5 dell'esempio 9 vi è stata aggiunta gradualmente
10 goccia a goccia ed agitata per coniugare il gruppo di collegamento del farmaco all'anticorpo in un bagno d'acqua di 15°C per 1 ora. In seguito, una soluzione acquosa (0,0418 ml; 12,9 equivalenti per molecola anticorpale) di NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vi è stata aggiunta ed agitata per terminare la reazione del gruppo di collegamento del farmaco a temperatura ambiente per 20 minuti.

15 Purificazione: la soluzione di cui sopra è stata sottoposta a purificazione utilizzando la procedura comune D descritta nel metodo di produzione 1 a dare 21,0 ml di una soluzione contenente il coniugato anticorpo-farmaco del titolo. Caratterizzazione chimico-fisica: utilizzando le procedure comuni E ed F descritte nel metodo di produzione 1 (sono stati utilizzati $\epsilon_{D,280}=4.964$ (valore medio misurato), ed $\epsilon_{D,370}=18.982$ (valore medio misurato)), sono stati ottenuti i seguenti valori caratteristici.

20 Concentrazione dell'anticorpo: 2,19 mg/ml, resa dell'anticorpo: 46,0 mg (92%), numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune E: 3,6, e numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune F: 3,6.

[Esempio 12: produzione di un ADC con hTINA1-H1L1 (4)]

[Formula 28]



Procedimento 1: coniugato anticorpo-farmaco (4)

5 Riduzione dell'anticorpo: l'hTINA1-H1L1 prodotto nell'esempio 7 è stato preparato per avere una concentrazione dell'anticorpo di 10,0 mg/ml con PBS6,0/EDTA utilizzando la procedura comune B (come coefficiente di assorbimento a 280 nm, è stato utilizzato 1,54) e la procedura comune C descritte nel metodo di produzione 1. La soluzione (5,00 ml) è stata raccolta in un contenitore da 15 ml, caricata con una soluzione acquosa di idrogenofosfato di dipotassio 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 ml) con agitazione, e quindi agitata a 37°C per 10 minuti. Dopo avervi aggiunto una soluzione acquosa di TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,162 ml; 5,0 equivalenti per molecola anticorpale) con agitazione e confermando quindi che la soluzione aveva un pH di 7,0±0,1, il legame disolfuro alla parte cerniera nell'anticorpo è stato ridotto agitando a 37°C per 1 ora.

15 Coniugazione tra anticorpo e gruppo di collegamento del farmaco: dopo l'agitazione della soluzione di cui sopra per 10 minuti in un bagno d'acqua di 15°C, una soluzione in dimetilsolfossido (0,389 ml; 12,0 equivalenti per molecola anticorpale) contenente il composto 10mM ottenuto nel procedimento 5 dell'esempio 9 vi è stata aggiunta gradualmente goccia a goccia ed agitata per coniugare il gruppo di collegamento del farmaco all'anticorpo in un bagno d'acqua di 15°C

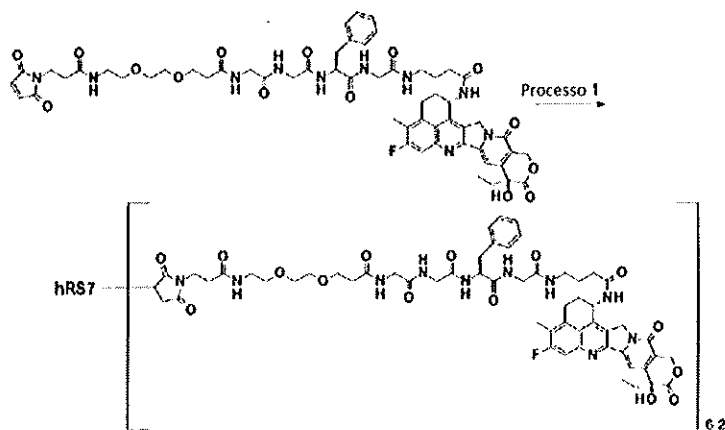
per 1 ora. In seguito, una soluzione acquosa (0,0418 ml; 12,9 equivalenti per molecola anticorpale) di NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vi è stata aggiunta ed agitata per terminare la reazione del gruppo di collegamento del farmaco a temperatura ambiente per 20 minuti.

5 Purificazione: la soluzione di cui sopra è stata sottoposta a purificazione utilizzando la procedura comune D descritta nel metodo di produzione 1 a dare 21,0 ml di una soluzione contenente il coniugato anticorpo-farmaco del titolo. Caratterizzazione chimico-fisica: utilizzando le procedure comuni E ed F descritte nel metodo di produzione 1 (sono stati utilizzati $\epsilon_{D,280}=4.964$ (valore medio misurato), ed $\epsilon_{D,370}=18.982$ (valore medio misurato)), sono stati ottenuti i seguenti valori caratteristici.

10 Concentrazione dell'anticorpo: 2,19 mg/ml, resa dell'anticorpo: 46,0 mg (92%), numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune E: 7,0, e numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune F: 7,0.

[Esempio di riferimento 13: produzione di un ADC con hRS7 (5)]

[Formula 29]



Procedimento 1: coniugato anticorpo-farmaco (5)

Riduzione dell'anticorpo: l'hRS7 prodotto nell'esempio di riferimento 1 è stato preparato per avere una concentrazione dell'anticorpo di 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA utilizzando la procedura comune B (come coefficiente di assorbimento a 280 nm, è stato utilizzato 1,56) e la procedura comune C descritte nel metodo di produzione 1. La soluzione (2,0 ml) è stata raccolta in una provetta da 4 ml e caricata con una soluzione acquosa di TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 ml; 5,0 equivalenti per molecola anticorpale) e con una soluzione acquosa di idrogenofosfato di dipotassio 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,100 ml). Dopo la conferma che la soluzione aveva un pH di $7,4 \pm 0,1$, il legame disolfuro alla parte cerniera nell'anticorpo è stato ridotto incubando a 37°C per 1 ora.

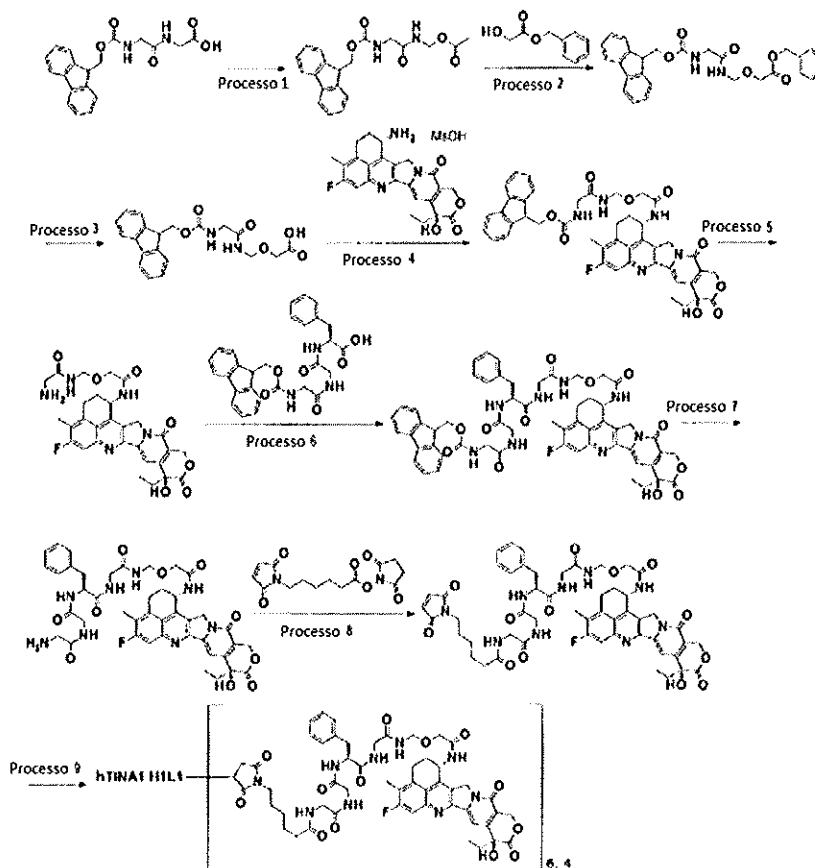
5
10
15
Coniugazione tra anticorpo e gruppo di collegamento del farmaco: dopo l'incubazione della soluzione di cui sopra per 10 minuti in un bagno d'acqua di 15°C, una soluzione in dimetilsolfossido (0,127 ml; 9,2 equivalenti per molecola anticorpale) contenente il composto 10mM ottenuto nel procedimento 5 dell'esempio 9 vi è stata aggiunta ed incubata per coniugare il gruppo di collegamento del farmaco all'anticorpo in un bagno d'acqua di 15°C per 1 ora. In seguito, una soluzione acquosa (0,0190 ml; 13,8 equivalenti per molecola anticorpale) di NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vi è stata aggiunta ed agitata utilizzando un dispositivo di rotazione per provette per terminare la reazione del gruppo di collegamento del farmaco a temperatura ambiente per 20 minuti.

20
Purificazione: la soluzione di cui sopra è stata sottoposta a purificazione utilizzando la procedura comune D descritta nel metodo di produzione 1 a dare 9,00 ml di una soluzione contenente il coniugato anticorpo-farmaco del titolo. Caratterizzazione chimico-fisica: utilizzando la procedura comune E descritta nel metodo di produzione 1 (sono stati utilizzati $\epsilon_{D,280}=4.964$ (valore medio misurato), ed $\epsilon_{D,370}=18.982$ (valore medio misurato)), sono stati ottenuti i seguenti valori caratteristici.

Concentrazione dell'anticorpo: 2,04 mg/ml, resa dell'anticorpo: 18,4 mg (92%), e numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune E: 6,2.

[Esempio 14: produzione di un ADC con hTINA1-H1L1 (6)]

[Formula 30]



Procedimento 1: metil({N-[(9H-fluoren-9-ilmetossi)carbonil]glicil}ammino)acetato

Ad una miscela contenente N-9-fluorenilmetossicarbonilglicilglicina (4,33 g, 12,2 mmol), tetraidrofurano (120 ml), e toluene (40,0 ml), piridina (1,16 ml, 14,7 mmol) e tetracetato di piombo (6,84 g, 14,7 mmol) sono stati aggiunti e scaldati a refluxo per 5 ore. Dopo che la soluzione di reazione è stata fatta raffreddare fino a temperatura ambiente, le

parti insolubili sono state rimosse mediante filtrazione attraverso Celite, e concentrate a pressione ridotta. I residui ottenuti sono stati disciolti in acetato di etile e lavati con acqua e con una soluzione salina satura, e quindi lo strato organico è stato anidrificato su solfato di magnesio anidro. Dopo che il solvente è stato rimosso a pressione ridotta, i residui ottenuti sono stati purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice [esano:acetato di etile=9:1 (v/v)-acetato di etile] a dare il composto del titolo come solido incolore (3,00 g, 67%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2,07 (3H, s), 3,90 (2H, d, J=5,1 Hz), 4,23 (1H, t, J=7,0 Hz), 4,46 (2H, d, J=6,6 Hz), 5,26 (2H, d, J=7,0 Hz), 5,32 (1H, s largo), 6,96 (1H, s largo), 7,32 (2H, t, J=7,3 Hz), 7,41 (2H, t, J=7,3 Hz), 7,59 (2H, d, J=7,3 Hz), 7,77 (2H, d, J=7,3 Hz).

Procedimento 2: benzil[({N-[(9H-fluoren-9-ilmetossi)carbonil]glicil}ammino)metossi]acetato

Ad una soluzione di tetraidrofurano (40,0 ml) del composto (3,68 g, 10,0 mmol) ottenuto nel procedimento 1 sopra e benzil glicolato (4,99 g, 30,0 mmol), tert-butossido di potassio (2,24 g, 20,0 mmol) è stato aggiunto a 0°C ed agitato a temperatura ambiente per 15 minuti. La soluzione di reazione è stata caricata con acetato di etile ed acqua a 0°C ed estratta con acetato di etile e cloroformio. Lo strato organico ottenuto è stato anidrificato su solfato di sodio e filtrato. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta. I residui ottenuti sono stati disciolti in diossano (40,0 ml) ed acqua (10,0 ml), caricati con bicarbonato di sodio (1,01 g, 12,0 mmol) e 9-fluorenilmetilcloroformiato (2,59 g, 10,0 mmol), ed agitati a temperatura ambiente per 2 ore. La soluzione di reazione è stata caricata con acqua ed estratta con acetato di etile. Lo strato organico ottenuto è stato anidrificato su solfato di sodio e filtrato. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta ed i residui ottenuti sono stati purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice [esano:acetato di etile=100:0 (v/v)-0:100] a dare il composto del titolo in una sostanza oleosa incolore (1,88 g, 40%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3,84 (2H, d, J=5,5 Hz), 4,24 (3H, t, J=6,5 Hz), 4,49 (2H, d, J=6,7 Hz), 4,88 (2H, d, J=6,7 Hz), 5,15-5,27 (1H, m), 5,19 (2H, s), 6,74 (1H, s largo), 7,31-7,39 (7H, m), 7,43 (2H, t, J=7,4 Hz), 7,61 (2H, d, J=7,4 Hz), 7,79 (2H, d, J=7,4 Hz).

Procedimento 3: acido [({N-[(9H-fluoren-9-ilmetossi)carbonil]glicil}ammino)metossi]acetico

Il composto (1,88 g, 3,96 mmol) ottenuto nel procedimento 2 sopra è stato disciolto in etanolo (40,0 ml) ed acetato di etile (20,0 ml). Dopo aver aggiunto un catalizzatore di palladio su carbone (376 mg), è stato agitato in atmosfera

di idrogeno a temperatura ambiente per 2 ore. Le parti insolubili sono state rimosse mediante filtrazione attraverso Celite, ed il solvente è stato rimosso a pressione ridotta a dare il composto del titolo come solido incolore (1,52 g, quantitativa).
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 3,62 (2H, d, J=6,3 Hz), 3,97 (2H, s), 4,18-4,32 (3H, m), 4,60 (2H, d, J=6,7 Hz), 7,29-7,46 (4H, m), 7,58 (1H, t, J=5,9 Hz), 7,72 (2H, d, J=7,4 Hz), 7,90 (2H, d, J=7,4 Hz), 8,71 (1H, t, J=6,5 Hz).

5 Procedimento 4: 9H-fluoren-9-ilmetil(2-[[2-[[[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]ammino}-2-ossoetossi)metil]ammino]-2-ossoetil)carbammato

10 Sotto raffreddamento con ghiaccio, ad una soluzione in N,N-dimetilformammide (10,0 ml) di exatecano mesilato (0,283 g, 0,533 mmol), N-idrossisuccinimmide (61,4 mg, 0,533 mmol), ed il composto (0,205 g, 0,533 mmol) ottenuto nel procedimento 3 sopra, N,N-diisopropilettilammina (92,9 μl, 0,533 mmol) ed N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (0,143 g, 0,693 mmol) sono state aggiunte ed agitate a temperatura ambiente per 3 giorni. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta ed i residui ottenuti sono stati purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice [cloroformio-strato organico ripartito di cloroformio:metanolo:acqua=7:3:1 (v/v/v)] a dare il composto del titolo come solido marrone chiaro (0,352 g, 82%).

15 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,81 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,73-1,87 (2H, m), 2,06-2,20 (2H, m), 2,34 (3H, s), 3,01-3,23 (2H, m), 3,58 (2H, d, J=6,7 Hz), 3,98 (2H, s), 4,13-4,25 (3H, m), 4,60 (2H, d, J=6,7 Hz), 5,09-5,22 (2H, m), 5,32-5,42 (2H, m), 5,50-5,59 (1H, m), 6,49 (1H, s), 7,24-7,30 (3H, m), 7,36 (2H, t, J=7,4 Hz), 7,53 (1H, t, J=6,3 Hz), 7,66 (2H, d, J=7,4 Hz), 7,75 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,84 (2H, d, J=7,4 Hz), 8,47 (1H, d, J=8,6 Hz), 8,77 (1H, t, J=6,7 Hz).
 MS (ESI) m/z: 802 (M+H)⁺.

20 Procedimento 5: N-[(2-[[[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]ammino}-2-ossoetossi)metil]glicinammide

25 Ad una soluzione in N,N-dimetilformammide (11,0 ml) del composto (0,881 g, 1,10 mmol) ottenuto nel procedimento 4 sopra, piperidina (1,1 ml) è stata aggiunta ed agitata a temperatura ambiente per 2 ore. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta a dare una miscela contenente il composto del titolo. La miscela è stata utilizzata per la reazione successiva senza ulteriore purificazione.

Procedimento 6: N-[(9H-fluoren-9-ilmetossi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]ammino}-2-ossoetossi)metil]glicinammide

5 Sotto raffreddamento con ghiaccio, ad una soluzione in N,N-dimetilformammide (50,0 ml) della miscela (0,439 mmol) ottenuta nel procedimento 5 sopra, N-idrossisuccinimide (0,101 g, 0,878 mmol), ed N-[(9H-fluoren-9-ilmetossi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanina (brevetto giapponese aperto al pubblico No. 2002-60351; 0,440 g, 0,878 mmol), N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (0,181 g, 0,878 mmol) è stata aggiunta ed agitata a temperatura ambiente per 4 giorni. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta ed i residui ottenuti sono stati purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice [cloroformio-cloroformio:metanolo=9:1 (v/v)] a dare il composto del titolo come solido arancione
10 chiaro (0,269 g, 58%).

MS (ESI) m/z: 1063 (M+H)⁺.

Procedimento 7: glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]ammino}-2-ossoetossi)metil]glicinammide

15 Ad una soluzione in N,N-dimetilformammide (4,00 ml) del composto (0,269 g, 0,253 mmol) ottenuto nel procedimento 6 sopra, piperidina (0,251 ml, 2,53 mmol) è stata aggiunta ed agitata a temperatura ambiente per 2 ore. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta a dare una miscela contenente il composto del titolo. La miscela è stata utilizzata per la reazione successiva senza ulteriore purificazione.

Procedimento 8: N-[6-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)esanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-
20 b]chinolin-1-il]ammino}-2-ossoetossi)metil]glicinammide

Ad una soluzione di N,N-dimetilformammide (10,0 ml) del composto (0,253 mmol) ottenuto nel procedimento 7 sopra, N-succinimidil 6-maleimmide esanoato (0,156 g, 0,506 mmol) è stato aggiunto ed agitato a temperatura ambiente per 3 giorni. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta ed i residui ottenuti sono stati purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice [cloroformio-cloroformio:metanolo=9:1 (v/v)] a dare il composto del titolo come
25 solido giallo chiaro (0,100 g, 38%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,83 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,09-1,21 (2H, m), 1,33-1,47 (4H, m), 1,75-1,90 (2H, m), 2,00-2,23 (4H, m), 2,36 (3H, s), 2,69-2,81 (1H, m), 2,94-3,03 (1H, m), 3,06-3,22 (2H, m), 3,23-3,74 (8H, m), 3,98 (2H, s), 4,39-4,50 (1H, m), 4,60 (2H, d, J=6,7 Hz), 5,17 (2H, s), 5,39 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,50 (1H, s), 6,96 (2H, s), 7,11-7,24 (5H, m), 7,28 (1H, s), 7,75 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,97 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,09 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,27 (1H, t, J=6,5 Hz), 8,48 (1H, d, J=9,0 Hz), 8,60 (1H, t, J=6,5 Hz).

MS (ESI) m/z: 1034 (M+H)⁺.

Procedimento 9: coniugato anticorpo-farmaco (6)

Riduzione dell'anticorpo: l'hTINA1-H1L1 prodotto nell'esempio 7 è stato preparato per avere una concentrazione dell'anticorpo di 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA utilizzando la procedura comune B (come coefficiente di assorbimento a 280 nm, è stato utilizzato 1,54) e la procedura comune C descritte nel metodo di produzione 1. La soluzione (10,0 ml) è stata raccolta in una provetta da 50 ml e caricata con una soluzione acquosa di TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 ml; 4,6 equivalenti per molecola anticorpale) e con una soluzione acquosa di idrogenofosfato di dipotassio 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 ml). Dopo la conferma che la soluzione aveva un pH di 7,4±0,1, il legame disolfuro alla parte cerniera nell'anticorpo è stato ridotto incubando a 37°C per 1 ora.

Coniugazione tra anticorpo e gruppo di collegamento del farmaco: dopo l'incubazione della soluzione di cui sopra per 10 minuti in un bagno d'acqua di temperatura ordinaria, vi è stato aggiunto dimetilsolfossido (0,567 ml). Successivamente, una soluzione in dimetilsolfossido contenente il composto 10mM ottenuto nel procedimento 8 di cui sopra (0,635 ml; 9,2 equivalenti per molecola anticorpale) vi è stata aggiunta ed agitata utilizzando un dispositivo di rotazione per provette per coniugare il gruppo di collegamento del farmaco all'anticorpo a temperatura ambiente per 40 minuti. In seguito, una soluzione acquosa (0,127 ml; 18,4 equivalenti per molecola anticorpale) di NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vi è stata aggiunta ed agitata per terminare la reazione del gruppo di collegamento del farmaco a temperatura ambiente per altri 20 minuti.

Purificazione: la soluzione di cui sopra è stata sottoposta a purificazione utilizzando la procedura comune D descritta nel metodo di produzione 1 a dare 35,0 ml di una soluzione contenente il coniugato anticorpo-farmaco del titolo.

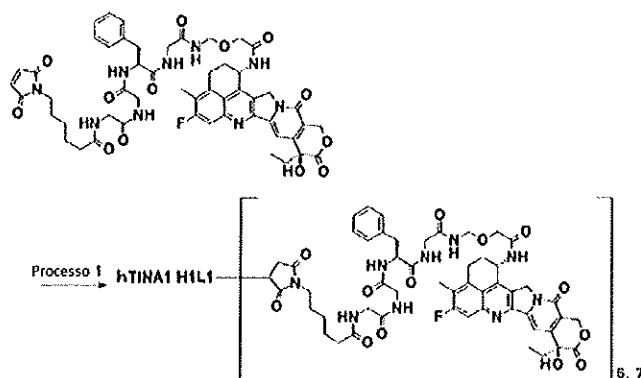
Caratterizzazione chimico-fisica: utilizzando la procedura comune E descritta nel metodo di produzione 1 (sono stati

utilizzati $\epsilon_{D,280}=5.178$ (valore medio misurato), ed $\epsilon_{D,370}=20.217$ (valore medio misurato)), sono stati ottenuti i seguenti valori caratteristici.

Concentrazione dell'anticorpo: 2,70 mg/ml, resa dell'anticorpo: 94,5 mg (95%), e numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune E: 6,4.

5 [Esempio 15: produzione di un ADC con hTINA1-H1L1 (7)]

[Formula 31]



Procedimento 1: coniugato anticorpo-farmaco (7)

10 Riduzione dell'anticorpo: l'hTINA1-H1L1 prodotto nell'esempio 7 è stato preparato per avere una concentrazione dell'anticorpo di 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA utilizzando la procedura comune B (come coefficiente di assorbimento a 280 nm, è stato utilizzato 1,54) e la procedura comune C descritte nel metodo di produzione 1. La soluzione (2,0 ml) è stata raccolta in una provetta da 4 ml e caricata con una soluzione acquosa di TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 ml; 5,0 equivalenti per molecola anticorpale) e con una soluzione acquosa di idrogenofosfato di dipotassio 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0299 ml). Dopo la conferma che la soluzione aveva un pH di

15 7,0±0,1, il legame disolfuro alla parte cerniera nell'anticorpo è stato ridotto incubando a 37°C per 1 ora.

Coniugazione tra anticorpo e gruppo di collegamento del farmaco: dopo l'incubazione della soluzione di cui

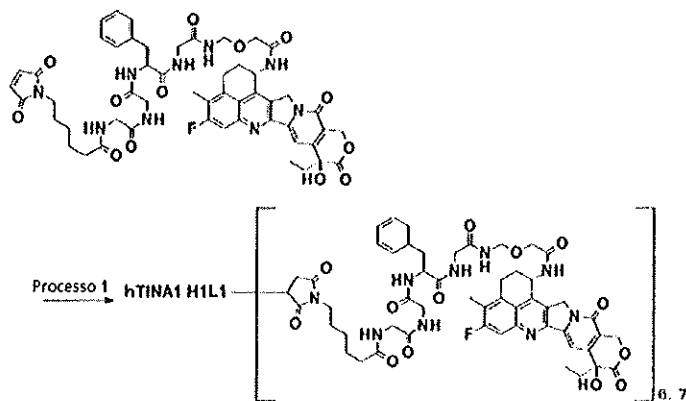
sopra per 10 minuti in un bagno d'acqua di 15°C, una soluzione in dimetilsolfossido (0,127 ml; 9,2 equivalenti per molecola anticorpale) contenente il composto 10mM ottenuto nel procedimento 8 dell'esempio 14 vi è stata aggiunta ed incubata per coniugare il gruppo di collegamento del farmaco all'anticorpo in un bagno d'acqua di 15°C per 1 ora. In seguito, una soluzione acquosa (0,0190 ml; 13,8 equivalenti per molecola anticorpale) di NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vi è stata aggiunta ed agitata utilizzando un dispositivo di rotazione per provette per terminare la reazione del gruppo di collegamento del farmaco a temperatura ambiente per 20 minuti.

Purificazione: la soluzione di cui sopra è stata sottoposta a purificazione utilizzando la procedura comune D descritta nel metodo di produzione 1 a dare 9,00 ml di una soluzione contenente il coniugato anticorpo-farmaco del titolo. Caratterizzazione chimico-fisica: utilizzando la procedura comune E descritta nel metodo di produzione 1 (sono stati utilizzati $\epsilon_{D,280}=5.178$ (valore medio misurato), ed $\epsilon_{D,370}=20.217$ (valore medio misurato)), sono stati ottenuti i seguenti valori caratteristici.

Concentrazione dell'anticorpo: 2,04 mg/ml, resa dell'anticorpo: 18,4 mg (92%), e numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune E: 5,7.

[Esempio 16: produzione di un ADC con hTINA1-H1L1 (8)]

[Formula 32]



15

Procedimento 1: coniugato anticorpo-farmaco (8)

Riduzione dell'anticorpo: l'hTINA1-H1L1 prodotto nell'esempio 7 è stato preparato per avere una concentrazione dell'anticorpo di 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA utilizzando la procedura comune B (come coefficiente di assorbimento a 280 nm, è stato utilizzato 1,54) e la procedura comune C descritte nel metodo di produzione 1. La soluzione (30,0 ml) è stata raccolta in un contenitore da 100 ml, caricata con una soluzione acquosa di idrogenofosfato di dipotassio 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,4875 ml) con agitazione, e quindi agitata a 37°C per 10 minuti. Dopo avervi aggiunto una soluzione acquosa di TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,9721 ml; 5,0 equivalenti per molecola anticorpale) con agitazione e confermando quindi che la soluzione aveva un pH di $7,0 \pm 0,1$, il legame disolfuro alla parte cerniera nell'anticorpo è stato ridotto agitando a 37°C per 1 ora.

Coniugazione tra anticorpo e gruppo di collegamento del farmaco: dopo l'agitazione della soluzione di cui sopra per 10 minuti in un bagno d'acqua di 15°C, una soluzione in dimetilsolfossido (2,33 ml; 12,0 equivalenti per molecola anticorpale) contenente il composto 10mM ottenuto nel procedimento 8 dell'esempio 14 vi è stata aggiunta gradualmente goccia a goccia ed agitata per coniugare il gruppo di collegamento del farmaco all'anticorpo in un bagno d'acqua di 15°C per 1 ora. In seguito, una soluzione acquosa (0,251 ml; 12,9 equivalenti per molecola anticorpale) di NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vi è stata aggiunta ed agitata per terminare la reazione del gruppo di collegamento del farmaco a temperatura ambiente per 20 minuti.

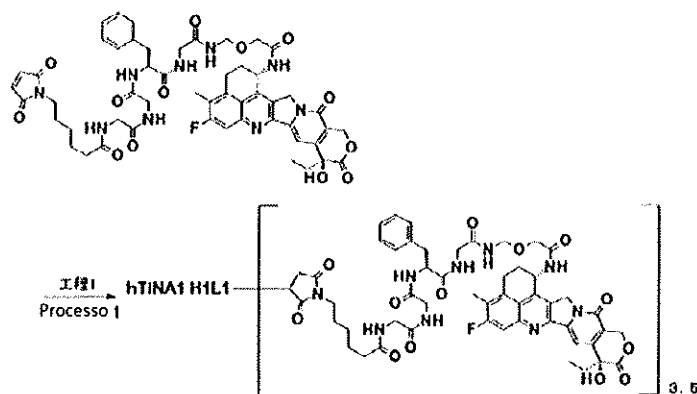
Purificazione: la soluzione di cui sopra è stata sottoposta a purificazione utilizzando la procedura comune D descritta nel metodo di produzione 1 a dare 98,0 ml di una soluzione contenente il coniugato anticorpo-farmaco del titolo. Quindi, la soluzione è stata concentrata secondo la procedura comune A descritta nel metodo di produzione 1 a dare 17,5 ml di una soluzione contenente il coniugato anticorpo-farmaco del titolo.

Caratterizzazione chimico-fisica: utilizzando le procedure comuni E ed F descritte nel metodo di produzione 1 (sono stati utilizzati $\epsilon_{D,280}=5.178$ (valore medio misurato), ed $\epsilon_{D,370}=20.217$ (valore medio misurato)), sono stati ottenuti i seguenti valori caratteristici. Concentrazione dell'anticorpo: 14,6 mg/ml, resa dell'anticorpo: 256 mg (85%), numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune E: 6,7, e numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune F:

7,0.

[Esempio 17: produzione di un ADC con hTINA1-H1L1 (9)]

[Formula 33]



Procedimento 1: coniugato anticorpo-farmaco (9)

5 Riduzione dell'anticorpo: l'hTINA1-H1L1 prodotto nell'esempio 7 è stato preparato per avere una concentrazione dell'anticorpo di 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA utilizzando la procedura comune B (come coefficiente di assorbimento a 280 nm, è stato utilizzato 1,54) e la procedura comune C descritte nel metodo di produzione 1. La soluzione (5,0 ml) è stata raccolta in un contenitore da 15 ml, caricata con una soluzione acquosa di idrogenofosfato di dipotassio 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 ml) con agitazione, e quindi agitata a 37°C per 10 minuti. Dopo avervi
 10 aggiunto una soluzione acquosa di TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0778 ml; 2,4 equivalenti per molecola anticorpale) con agitazione e confermando quindi che la soluzione aveva un pH di 7,0±0,1, il legame disolfuro alla parte cerniera nell'anticorpo è stato ridotto agitando a 37°C per 1 ora.

15 Coniugazione tra anticorpo e gruppo di collegamento del farmaco: dopo l'agitazione della soluzione di cui sopra per 10 minuti in un bagno d'acqua di 15°C, una soluzione in dimetilsolfossido (0,162 ml; 5,0 equivalenti per molecola anticorpale) contenente il composto 10mM ottenuto nel procedimento 8 dell'esempio 14 vi è stata aggiunta gradualmente

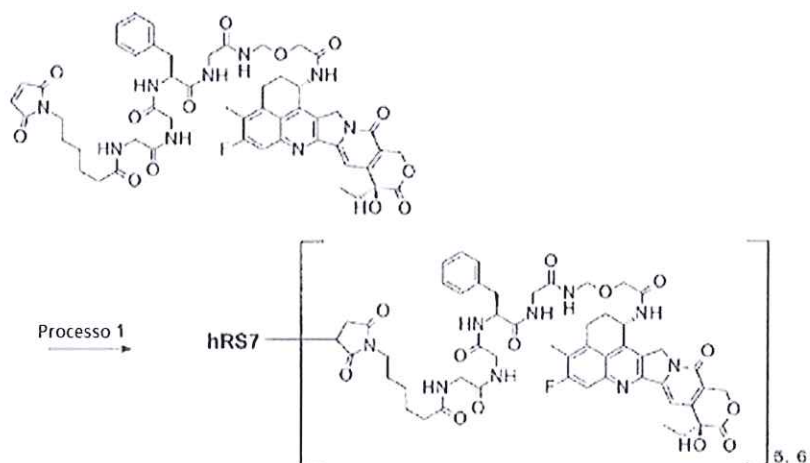
goccia a goccia ed agitata per coniugare il gruppo di collegamento del farmaco all'anticorpo in un bagno d'acqua di 15°C per 1 ora. In seguito, una soluzione acquosa (0,0418 ml; 12,9 equivalenti per molecola anticorpale) di NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vi è stata aggiunta ed agitata per terminare la reazione del gruppo di collegamento del farmaco a temperatura ambiente per 20 minuti.

5 Purificazione: la soluzione di cui sopra è stata sottoposta a purificazione utilizzando la procedura comune D descritta nel metodo di produzione 1 a dare 21,0 ml di una soluzione contenente il coniugato anticorpo-farmaco del titolo. Caratterizzazione chimico-fisica: utilizzando le procedure comuni E ed F descritte nel metodo di produzione 1 (sono stati utilizzati $\epsilon_{D,280}=5.178$ (valore medio misurato), ed $\epsilon_{D,370}=20.217$ (valore medio misurato)), sono stati ottenuti i seguenti valori caratteristici.

10 Concentrazione dell'anticorpo: 2,26 mg/ml, resa dell'anticorpo: 47,5 mg (95%), numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune E: 3,5, e numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune F: 3,6.

[Esempio di riferimento 18: produzione di un ADC con hRS7 (10)]

[Formula 34]





Procedimento 1: coniugato anticorpo-farmaco (10)

Riduzione dell'anticorpo: l'hRS7 prodotto nell'esempio di riferimento 1 è stato preparato per avere una concentrazione dell'anticorpo di 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA utilizzando la procedura comune B (come coefficiente di assorbimento a 280 nm, è stato utilizzato 1,56) e la procedura comune C descritte nel metodo di produzione 1. La
5 soluzione (2,0 ml) è stata raccolta in una provetta da 4 ml e caricata con una soluzione acquosa di TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 ml; 5,0 equivalenti per molecola anticorpale) e con una soluzione acquosa di idrogenofosfato di dipotassio 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0299 ml). Dopo la conferma che la soluzione aveva un pH di $7,0 \pm 0,1$, il legame disolfuro alla parte cerniera nell'anticorpo è stato ridotto incubando a 37°C per 1 ora.

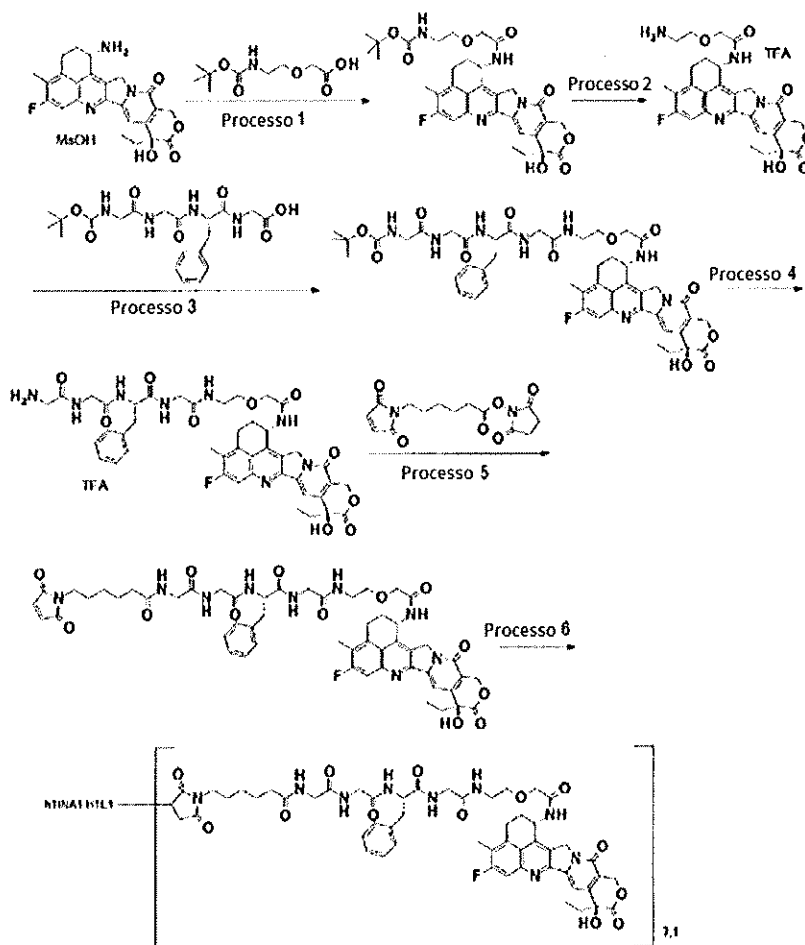
10 Coniugazione tra anticorpo e gruppo di collegamento del farmaco: dopo l'incubazione della soluzione di cui sopra per 10 minuti in un bagno d'acqua di 15°C, una soluzione in dimetilsolfossido (0,1269 ml; 9,2 equivalenti per molecola anticorpale) contenente il composto 10mM ottenuto nel procedimento 8 dell'esempio 14 vi è stata aggiunta ed incubata per coniugare il gruppo di collegamento del farmaco all'anticorpo in un bagno d'acqua di 15°C per 1 ora. In
15 seguito, una soluzione acquosa (0,0190 ml; 13,8 equivalenti per molecola anticorpale) di NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vi è stata aggiunta ed agitata utilizzando un dispositivo di rotazione per provette per terminare la reazione del gruppo di collegamento del farmaco a temperatura ambiente per 20 minuti.

Purificazione: la soluzione di cui sopra è stata sottoposta a purificazione utilizzando la procedura comune D descritta nel metodo di produzione 1 a dare 9,00 ml di una soluzione contenente il coniugato anticorpo-farmaco del titolo. Caratterizzazione chimico-fisica: utilizzando la procedura comune E descritta nel metodo di produzione 1 (sono stati
20 utilizzati $\epsilon_{D,280}=5.178$ (valore medio misurato), ed $\epsilon_{D,370}=20.217$ (valore medio misurato)), sono stati ottenuti i seguenti valori caratteristici.

Concentrazione dell'anticorpo: 2,07 mg/ml, resa dell'anticorpo: 18,6 mg (93%), e numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune E: 5,6.

[Esempio 19: produzione di un ADC con hTINA1-H1L1 (11)]

[Formula 35]



Procedimento 1: tert-butil [2-(2-[[[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-

1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]ammino}-2-ossoetossi)etil]carbammato

Exatecano mesilato (3,10 g, 5,47 mol) è stato fatto reagire nello stesso modo del procedimento 1 dell'esempio 1 utilizzando acido {2-[(tert-butossicarbonil)ammino]etossi}acetico (J. Med. Chem., 1992, volume 35, pagina 2928; 1,55 g, 6,01 mmol) invece di acido 4-(tert-butossicarbonilammino)butanoico a dare il composto del titolo come solido giallo chiaro (2,56 g, 73%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,26 (9H, s), 1,81-1,91 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 3,08-3,26 (4H, m), 3,43-3,53 (2H, m), 4,00 (1H, d, J=15,1 Hz), 4,05 (1H, d, J=15,1 Hz), 5,14 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,22 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,40 (1H, d, J=16,6 Hz), 5,44 (1H, d, J=16,6 Hz), 5,59-5,66 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,86 (1H, t, J=5,4 Hz), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d, J=10,9 Hz), 8,49 (1H, d, J=9,1 Hz).

MS (APCI) m/z: 637 (M+H)⁺.

Procedimento 2: 2-(2-amminoetossi)-N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]acetammide trifluoroacetato

Il composto (1,50 g, 2,36 mol) ottenuto nel procedimento 1 sopra è stato fatto reagire nello stesso modo del procedimento 2 dell'esempio 1 a dare il composto del titolo come solido giallo chiaro (1,50 g, quantitativa).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,5 Hz), 1,81-1,92 (2H, m), 2,15-2,23 (2H, m), 2,41 (3H, s), 3,05 (2H, t, J=5,1 Hz), 3,15-3,23 (2H, m), 3,71 (2H, t, J=5,1 Hz), 4,10 (2H, s), 5,19 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,24 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,43 (2H, s), 5,58-5,66 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,33 (1H, s), 7,73-7,84 (4H, m), 8,55 (1H, d, J=9,1 Hz).

MS (APCI) m/z: 537 (M+H)⁺.

Procedimento 3: N-(tert-butossicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-(2-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]ammino)-2-ossoetossi)etil]glicinammide

Il composto (554 mg, 0,85 mmol) ottenuto nel procedimento 2 sopra è stato fatto reagire nello stesso modo del procedimento 3 dell'esempio 1 a dare il composto del titolo (775 mg, 95%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,85 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,36 (9H, s), 1,78-1,89 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H, dd, J=13,4, 9,8 Hz), 2,95 (1H, dd, J=13,4, 4,3 Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,23-3,32 (2H, m), 3,40-3,62 (8H, m),

3,73 (1H, dd, J=16,5, 5,5 Hz), 4,03 (2H, s), 4,39-4,47 (1H, m), 5,17 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,41 (1H, d, J=16,8 Hz), 5,45 (1H, d, J=16,8 Hz), 5,57-5,64 (1H, m), 6,54 (1H, s), 6,99 (1H, t, J=5,8 Hz), 7,13-7,26 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,76-7,82 (2H, m), 7,90 (1H, t, J=5,2 Hz), 8,13 (1H, d, J=7,9 Hz), 8,27 (1H, t, J=5,8 Hz), 8,49 (1H, d, J=8,5 Hz).

5 MS (APCI) m/z: 955 (M+H)⁺.

Procedimento 4: glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-(2-{{(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]ammino}-2-ossoetossi)etil]glicinammide trifluoroacetato

10 Il composto (630 mg, 0,659 mmol) ottenuto nel procedimento 3 sopra è stato fatto reagire nello stesso modo del procedimento 4 dell'esempio 1 a dare il composto del titolo (588 mg, 92%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,79-1,90 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H, dd, J=13,4, 10,1 Hz), 2,99 (1H, dd, J=13,4, 4,3 Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,24-3,32 (3H, m), 3,41-3,71 (7H, m), 3,86 (1H, dd, J=16,8, 5,8 Hz), 4,04 (2H, s), 4,52 (1H, td, J=9,0, 4,1 Hz), 5,17 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,41 (1H, d, J=16,5 Hz), 5,45 (1H, d, J=16,5 Hz), 5,56-5,65 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,13-7,26 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,80 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,87-8,01 (4H, m), 8,29-8,36 (2H, m), 8,46-8,55 (2H, m).

15 MS (APCI) m/z: 855 (M+H)⁺.

Procedimento 5: N-[6-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)esanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[2-(2-{{(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-idrossi-4-metil-10,13-diosso-2,3,9,10,13,15-esaidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-1-il]ammino}-2-ossoetossi)etil]glicinammide

20 Il composto (240 mg, 0,247 mmol) ottenuto nel procedimento 4 sopra è stato fatto reagire nello stesso modo del procedimento 5 dell'esempio 1 utilizzando trietilammina (31,4 µl, 0,22 mmol) invece di diisopropilettilammina ed N-succinimmidil 6-maleimmide esanoato (95,3 mg, 0,31 mmol) invece di N-succinimmidil 3-(2-(2-(3-maleinimmidopropanammido)etossi)etossi)propanoato a dare il composto del titolo (162 mg, 62%).

25 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J=7,6 Hz), 1,13-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,78-1,90 (2H, m), 2,09 (2H, t, J=7,6 Hz), 2,14-2,21 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,74 (1H, dd, J=13,6, 9,7 Hz), 2,96 (1H, dd, J=13,6, 4,5 Hz), 3,08-3,24

(1H, m), 3,24-3,30 (1H, m), 3,33-3,40 (4H, m), 3,47-3,68 (7H, m), 3,72 (1H, dd, J=16,6, 5,7 Hz), 4,03 (2H, s), 4,42 (1H, td, J=8,6, 4,2 Hz), 5,17 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,40 (1H, d, J=17,2 Hz), 5,44 (1H, d, J=17,2 Hz), 5,57-5,64 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,13-7,25 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,81 (2H, m), 7,99 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,03-8,11 (2H, m), 8,22 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,47 (1H, d, J=9,1 Hz).

5 MS (APCI) m/z: 1048 (M+H)⁺.

Procedimento 6: coniugato anticorpo-farmaco (11)

Riduzione dell'anticorpo: l'hTINA1-H1L1 prodotto nell'esempio 7 è stato preparato per avere una concentrazione dell'anticorpo di 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA utilizzando la procedura comune B (come coefficiente di assorbimento a 280 nm, è stato utilizzato 1,54) e la procedura comune C descritte nel metodo di produzione 1. La soluzione (3,0 ml) è stata raccolta in un contenitore da 15 ml, caricata con una soluzione acquosa di idrogenofosfato di dipotassio 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0488 ml) con agitazione, e quindi agitata a 37°C per 10 minuti. Dopo avervi aggiunto una soluzione acquosa di TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0972 ml; 5,0 equivalenti per molecola anticorpale) con agitazione e confermando quindi che la soluzione aveva un pH di 7,0±0,1, il legame disolfuro alla parte cerniera nell'anticorpo è stato ridotto agitando a 37°C per 1 ora.

15 Coniugazione tra anticorpo e gruppo di collegamento del farmaco: dopo l'agitazione della soluzione di cui sopra per 10 minuti in un bagno d'acqua di 15°C, una soluzione in dimetilsolfossido (0,2333 ml; 12,0 equivalenti per molecola anticorpale) contenente il composto 10mM ottenuto nel procedimento 8 dell'esempio 11 vi è stata aggiunta gradualmente goccia a goccia ed agitata per coniugare il gruppo di collegamento del farmaco all'anticorpo in un bagno d'acqua di 15°C per 1 ora. In seguito, una soluzione acquosa (0,0251 ml; 12,9 equivalenti per molecola anticorpale) di NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vi è stata aggiunta ed agitata per terminare la reazione del gruppo di collegamento del farmaco a temperatura ambiente per 20 minuti.

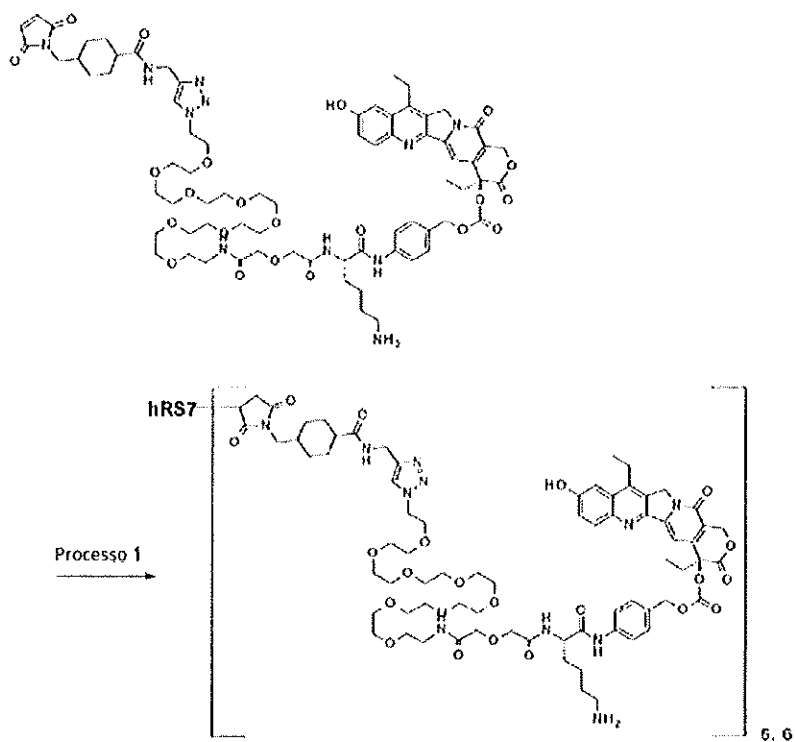
25 Purificazione: la soluzione di cui sopra è stata sottoposta a purificazione utilizzando la procedura comune D descritta nel metodo di produzione 1 a dare 14 ml di una soluzione contenente il coniugato anticorpo-farmaco del titolo. Caratterizzazione chimico-fisica: utilizzando le procedure comuni E ed F descritte nel metodo di produzione 1 (sono stati utilizzati $\epsilon_{D,280}=5.193$ (valore medio misurato), ed $\epsilon_{D,370}=20.347$ (valore medio misurato)), sono stati ottenuti i seguenti

valori caratteristici.

Concentrazione dell'anticorpo: 1,93 mg/ml, resa dell'anticorpo: 27,0 mg (90%), numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune E: 7,1, e numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune F: 7,0.

5 [Esempio di riferimento 2: produzione di hRS7-CL2A-SN-38 (12)]

[Formula 36]



Procedimento 1: coniugato anticorpo-farmaco (12)

Riduzione dell'anticorpo: l'hRS7 prodotto nell'esempio di riferimento 1 è stato preparato per avere una concentrazione dell'anticorpo di 10 mg/ml con PBS6,0/EDTA utilizzando la procedura comune B (come coefficiente di assorbimento a 280 nm, è stato utilizzato 1,54) e la procedura comune C descritte nel metodo di produzione 1. La soluzione (10,0 ml) è stata raccolta in una provetta da 50 ml e caricata con una soluzione acquosa di TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 ml; 4,6 equivalenti per molecola anticorpale) e con una soluzione acquosa di idrogenofosfato di dipotassio 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 ml). Dopo la conferma che la soluzione aveva un pH di $7,4 \pm 0,1$, il legame disolfuro alla parte cerniera nell'anticorpo è stato ridotto incubando a 37°C per 1 ora.

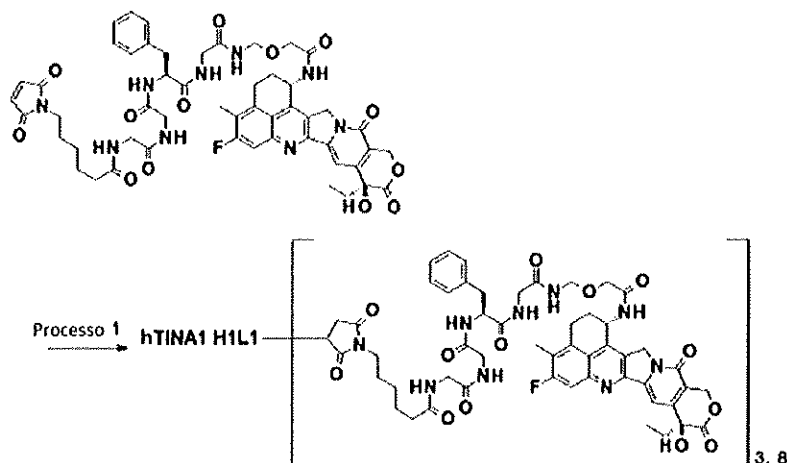
Coniugazione tra anticorpo e gruppo di collegamento del farmaco: dopo l'incubazione della soluzione di cui sopra per 10 minuti in un bagno d'acqua di temperatura ordinaria, vi è stato aggiunto dimetilsolfossido (0,567 ml). Successivamente, una soluzione in dimetilsolfossido contenente CL2A-SN-38 10mM sintetizzato secondo la pubblicazione del brevetto US No. 2011/0293513 (0,635 ml; 9,2 equivalenti per molecola anticorpale) vi è stata aggiunta ed agitata utilizzando un dispositivo di rotazione per provette per coniugare il gruppo di collegamento del farmaco all'anticorpo a temperatura ambiente per 40 minuti. In seguito, una soluzione acquosa (0,127 ml; 18,4 equivalenti per molecola anticorpale) di NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vi è stata aggiunta ed agitata per terminare la reazione del gruppo di collegamento del farmaco a temperatura ambiente per altri 20 minuti.

Purificazione: la soluzione di reazione di cui sopra è stata sottoposta ripetutamente due volte alla permeazione su gel ed alla purificazione descritte nella procedura comune D del metodo di produzione e successivamente sottoposta in modo simile alla purificazione mediante permeazione su gel con la colonna NAP-25 utilizzando una soluzione di trealosio 25mM contenente polisorbato 80 (0,01%). Quindi, l'eluato ottenuto (35 ml) è stato liofilizzato. Caratterizzazione chimico-fisica: utilizzando la procedura comune E descritta nel metodo di produzione 1 per l'eluato prima della liofilizzazione, sono stati ottenuti i seguenti valori caratteristici.

Concentrazione dell'anticorpo: 2,78 mg/ml, resa dell'anticorpo: 97,3 mg (97%), e numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale: 5,6.

[Esempio 20: produzione di un ADC con hTINA1-H1L1 (13)]

[Formula 37]



Procedimento 1: coniugato anticorpo-farmaco (13)

5 Riduzione dell'anticorpo: l'hTINA1-H1L1 prodotto nell'esempio 7 è stato preparato per avere una concentrazione dell'anticorpo di 10 mg/ml sostituendo il terreno con PBS6,0/EDTA utilizzando la procedura comune B (come coefficiente di assorbimento a 280 nm, è stato utilizzato 1,54) e la procedura comune C descritte nel metodo di produzione 1. La soluzione (100 ml) è stata posta in un pallone di Erlenmeyer di policarbonato da 250 ml, caricata con una soluzione acquosa di idrogenofosfato di dipotassio 1M (1,4 ml) a temperatura ambiente con agitazione utilizzando un agitatore magnetico, e quindi caricata con una soluzione acquosa di TCEP 10mM (1,62 ml; 2,5 equivalenti per

10 molecola anticorpale). Dopo la conferma che la soluzione aveva un pH di $7,0 \pm 0,1$, l'agitazione è stata terminata, ed il legame disolfuro alla parte cerniera nell'anticorpo è stato ridotto incubando a 37°C per 2 ore.

Coniugazione tra anticorpo e gruppo di collegamento del farmaco: dopo il raffreddamento della soluzione di cui sopra fino a 15°C , DMSO (3,24 ml) vi è stato aggiunto gradualmente goccia a goccia con agitazione. Successivamente, una soluzione di DMSO contenente il composto 10mM ottenuto nel procedimento 8 dell'esempio 14 (1,76 ml; 5,0

equivalenti per molecola anticorpale) vi è stata aggiunta gradualmente goccia a goccia. Questa soluzione è stata agitata per coniugare il gruppo di collegamento del farmaco all'anticorpo a 15°C per 1 ora. In seguito, una soluzione acquosa (0,324 ml; 5,0 equivalenti per molecola anticorpale) di NAC 100mM vi è stata aggiunta con agitazione ed incubata per terminare la reazione del gruppo di collegamento del farmaco non reagito a temperatura ambiente per altri 20 minuti.

5 Purificazione: una soluzione acquosa di acido acetico al 20% (circa 0,52 ml) ed ABS (100 ml) sono stati aggiunti gradualmente alla soluzione di cui sopra con agitazione per regolare il pH della soluzione a $5,5 \pm 0,1$. Questa soluzione è stata sottoposta a microfiltrazione (0,45 μm , membrana di PVDF) per rimuovere la torbidità bianca e dando circa 200 ml di un filtrato. Questo filtrato è stato sottoposto a purificazione mediante ultrafiltrazione utilizzando un apparecchio per
10 ultrafiltrazione costituito da una membrana per ultrafiltrazione (Merck Japan, cassetta Pellicon XL, Ultracell 30 kDa), una pompa a tubo (Cole-Parmer International, modello di pompa MasterFlex 77521-40, modello di testa della pompa 7518-00), ed una provetta (Cole-Parmer International, provetta MasterFlex L/S16). Specificamente, mentre l'ABS è stato aggiunto goccia a goccia (un totale di 1600 ml) come soluzione tampone per la purificazione alla soluzione di reazione, la purificazione mediante ultrafiltrazione è stata eseguita per rimuovere i gruppi di collegamento del farmaco non
15 coniugati ed altri reagenti a basso peso molecolare, anche sostituendo la soluzione tampone con ABS, e concentrando ulteriormente la soluzione. La soluzione purificata ottenuta è stata sottoposta a microfiltrazione (0,22 μm , membrana di PVDF) a dare 88 ml di una soluzione contenente il coniugato anticorpo-farmaco del titolo.

Caratterizzazione chimico-fisica: utilizzando la procedura comune E e la procedura comune F (sono stati utilizzati $\epsilon_{D,280}=5.178$, ed $\epsilon_{D,370}=20.217$), sono stati ottenuti i seguenti valori caratteristici.

20 Concentrazione dell'anticorpo: 9,96 mg/ml, resa dell'anticorpo: 876 mg (88%), numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune E: 3,8, e numero medio di molecole di farmaco coniugate (n) per molecola anticorpale misurato mediante la procedura comune F: 3,8.

[Esempio 21: valutazione dell'effetto antitumorale dell'ADC] 21-a) effetto antitumorale dell'ADC-(1)

25 Topo: topi femmine BALB/c-nu/nu da 5 a 6 settimane d'età (Charles River Laboratories Japan, Inc.) sono stati acclimatati da 4 a 7 giorni in condizioni SPF prima dell'uso nell'esperimento. I topi sono stati alimentati con cibo solido sterilizzato (FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd) ed hanno ricevuto acqua sterilizzata di rubinetto (preparata mediante

l'aggiunta da 5 a 15 ppm di soluzione di ipoclorito di sodio).

Saggio e calcolo dell'espressione: in tutti gli studi, l'asse maggiore e l'asse minore del tumore sono stati misurati due volte alla settimana utilizzando un calibro elettronico digitale (CD-15C, Mitutoyo Corp.), ed è stato calcolato il volume del tumore (mm³). L'espressione del calcolo è come mostrata sotto.

5 Volume del tumore (mm³)=1/2×asse maggiore (mm)×[asse minore (mm)]².

Tutti i coniugati anticorpo-farmaco sono stati diluiti con una soluzione salina fisiologica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) ed utilizzati ad un volume di 10 ml/kg per la somministrazione endovenosa alla coda di ciascun topo. Una linea cellulare umana di cancro del colon-retto COLO205 è stata acquistata da ATCC e sospesa in soluzione salina fisiologica. 2×10⁶ cellule della sospensione sono state trapiantate per via sottocutanea all'addome destro di ciascun topo
10 femmina BALB/c-nu/nu (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 7. I coniugati anticorpo-farmaco (1), (6), o (12) sono stati somministrati per via endovenosa ad una dose di 10 mg/kg alla coda di ciascun topo i giorni 7, 14, e 21. L'anticorpo hTINA1-H1L1 e l'anticorpo hRS7 non coniugati sono stati somministrati ciascuno come controllo negativo ad una dose di 25 mg/kg attraverso la stessa via di cui sopra. La somministrazione del coniugato anticorpo-farmaco (1) o (6) ha eccezionalmente diminuito il volume del tumore in confronto alla somministrazione del coniugato anticorpo-farmaco (12), ed entrambi i coniugati anticorpo-farmaco hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 13). Nel disegno, l'ascissa descrive il numero di giorni, e l'ordinata descrive il volume del tumore.

15 21-b) Effetto antitumorale dell'ADC-(2)

Una linea cellulare umana di adenocarcinoma del pancreas Bx-PC3 acquistata da ATCC è stata trapiantata a ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu ed ulteriormente sottoposta a passaggio come innesto di tumore solido. Questo
20 innesto del tumore è stato trapiantato per via sottocutanea all'addome destro di ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 16. I coniugati anticorpo-farmaco (1), (6), o (12) sono stati somministrati per via endovenosa ad una dose di 10 mg/kg alla coda di ciascun topo i giorni 16, 23, e 30. L'anticorpo hTINA1-H1L1 e l'anticorpo hRS7 non coniugati sono stati somministrati ciascuno come controllo negativo ad una dose di 25 mg/kg attraverso la stessa via di cui sopra. La somministrazione del coniugato anticorpo-farmaco (1) o (6) ha
25 eccezionalmente diminuito il volume del tumore in confronto alla somministrazione del coniugato anticorpo-farmaco

(12), ed entrambi i coniugati anticorpo-farmaco hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 14).

21-c) Effetto antitumorale dell'ADC-(3)

Una linea cellulare umana di adenocarcinoma del pancreas Capan-1 acquistata da ATCC è stata trapiantata a ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu ed ulteriormente sottoposta a passaggio come innesto di tumore solido. Questo
5 innesto del tumore è stato trapiantato per via sottocutanea all'addome destro di ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 18. I coniugati anticorpo-farmaco (1), (6), o (12) sono stati somministrati per via endovenosa ad una dose di 10 mg/kg alla coda di ciascun topo i giorni 18, 25, e 32. L'anticorpo hTINA1-H1L1 e l'anticorpo hRS7 non coniugati sono stati somministrati ciascuno come controllo negativo ad una dose di 25 mg/kg attraverso la stessa via di cui sopra. La somministrazione del coniugato anticorpo-farmaco (1) o (6) ha
10 eccezionalmente diminuito il volume del tumore in confronto alla somministrazione del coniugato anticorpo-farmaco (12), ed entrambi i coniugati anticorpo-farmaco hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 15).

21-d) Effetto antitumorale dell'ADC-(4)

COLO205 è stata trapiantata per via sottocutanea a ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu nello stesso modo dell'esempio 21-a) (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 11. Il coniugato anticorpo-farmaco
15 (2) o (5) ad una dose di 10 mg/kg ed il coniugato anticorpo-farmaco (7) o (10) ad una dose di 3 mg/kg sono stati somministrati per via endovenosa, rispettivamente, alla coda di ciascun topo i giorni 11, 18, e 25. Tutti i coniugati anticorpo-farmaco (2), (5), (7), e (10) somministrati hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 16).

21-e) Effetto antitumorale dell'ADC-(5)

20 Bx-PC3 è stata trapiantata per via sottocutanea a ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu nello stesso modo dell'esempio 21-b) (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 25. Il coniugato anticorpo-farmaco (2), (5), (7), o (10) è stato somministrato per via endovenosa ad una dose di 3 mg/kg alla coda di ciascun topo i giorni 25 e 32. Tutti i coniugati anticorpo-farmaco (2), (5), (7), e (10) somministrati hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 17).

21-f) Effetto antitumorale dell'ADC-(6)

COLO205 è stata trapiantata per via sottocutanea a ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu nello stesso modo dell'esempio 21-a) (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 9. Il coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) è stato somministrato per via endovenosa ad una dose di 10 mg/kg alla coda di ciascun topo i giorni 9 e 16.

5 Tutti i coniugati anticorpo-farmaco (3), (4), (8), e (9) somministrati hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 18).

21-g) Effetto antitumorale dell'ADC-(7)

Bx-PC3 è stata trapiantata per via sottocutanea a ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu nello stesso modo dell'esempio 21-b) (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 21. Il coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) è stato somministrato per via endovenosa ad una dose di 3 mg/kg alla coda di ciascun topo i giorni 21 e 28. Tutti i coniugati anticorpo-farmaco (3), (4), (8), e (9) somministrati hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 19).

10

21-h) Effetto antitumorale dell'ADC-(8)

8×10^6 cellule di una linea cellulare umana di cancro dell'ovaio NIH:OVCAR-3 acquistata da ATCC sono state sospese in Matrigel (Becton, Dickinson and Company) e trapiantate per via sottocutanea a ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 25. Il coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) è stato somministrato per via endovenosa ad una dose di 3 mg/kg alla coda di ciascun topo il giorno 25. Tutti i coniugati anticorpo-farmaco (3), (4), (8), e (9) somministrati hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 20).

15

20 21-i) Effetto antitumorale dell'ADC-(9)

1×10^7 cellule di una linea cellulare umana di cancro dello stomaco NCI-N87 acquistata da ATCC sono state sospese in soluzione salina fisiologica e trapiantate per via sottocutanea a ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 6. Il coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) è stato somministrato per via endovenosa ad una dose di 3 mg/kg alla coda di ciascun topo il giorno 6. Tutti i coniugati anticorpo-farmaco (3), (4), (8), e (9) somministrati hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 21).

25

21-j) Effetto antitumorale dell'ADC-(10)

5 5×10^6 cellule di una linea cellulare umana di cancro del polmone NCI-H292 acquistata da ATCC sono state sospese in soluzione salina fisiologica e trapiantate per via sottocutanea a ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 9. Il coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) è stato somministrato per via endovenosa ad una dose di 3 mg/kg alla coda di ciascun topo il giorno 9. Tutti i coniugati anticorpo-farmaco (3), (4), (8), e (9) somministrati hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 22).

21-k) Effetto antitumorale dell'ADC-(11)

10 3×10^6 cellule di una linea cellulare umana di cancro della gola FaDu acquistata da ATCC sono state sospese in soluzione salina fisiologica e trapiantate per via sottocutanea a ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 11. Il coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) è stato somministrato per via endovenosa ad una dose di 3 mg/kg alla coda di ciascun topo il giorno 11. Tutti i coniugati anticorpo-farmaco (3), (4), (8), e (9) somministrati hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 23).

21-l) Effetto antitumorale dell'ADC-(12)

15 4×10^6 cellule di una linea cellulare umana di adenocarcinoma del pancreas CFPAC-1 acquistata da ATCC sono state sospese in soluzione salina fisiologica e trapiantate per via sottocutanea a ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 14. Il coniugato anticorpo-farmaco (3), (4), (8), o (9) è stato somministrato per via endovenosa ad una dose di 3 mg/kg alla coda di ciascun topo il giorno 14. Tutti i coniugati anticorpo-farmaco (3), (4), (8), e (9) somministrati hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 24).

20 21-m) Effetto antitumorale dell'ADC-(13)

25 CFPAC-1 è stata trapiantata per via sottocutanea a ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu nello stesso modo dell'esempio 21-l (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 14. Il coniugato anticorpo-farmaco (8) o (13) è stato somministrato per via endovenosa ad una dose di 1 mg/kg alla coda di ciascun topo il giorno 14. Tutti i coniugati anticorpo-farmaco (8) o (13) somministrati hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 25).

21-n) Effetto antitumorale dell'ADC-(14)

3×10^6 cellule di una linea cellulare umana di adenocarcinoma del pancreas HPAC acquistata da ATCC sono state sospese in soluzione salina fisiologica e trapiantate per via sottocutanea a ciascun topo femmina BALB/c-nu/nu (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 12. Il coniugato anticorpo-farmaco (8) o (13) è stato somministrato per via endovenosa ad una dose di 3 mg/kg alla coda di ciascun topo il giorno 12. Tutti i coniugati anticorpo-farmaco (8) o (13) somministrati hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 26).

21-o) Effetto antitumorale dell'ADC-(15)

Tessuti umani di cancro dell'esofago ottenuti da Japan Health Sciences Foundation sono stati trapiantati per via sottocutanea a ciascun topo NOG (Central Institute for Experimental Animals) e fatti crescere. L'innesto di tumore ottenuto è stato ulteriormente trapiantato per via sottocutanea a ciascun topo femmina NOD-SCID (Charles River Laboratories Japan, Inc.) (giorno 0), ed i topi sono stati casualmente raggruppati il giorno 27. Il coniugato anticorpo-farmaco (8) o (13) è stato somministrato per via endovenosa ad una dose di 3 mg/kg alla coda di ciascun topo il giorno 27. Entrambi i coniugati anticorpo-farmaco (8) e (13) somministrati hanno esercitato un effetto inibitorio sulla crescita tumorale (figura 27).

[Esempio 22: valutazione dell'effetto di inibizione della crescita cellulare dell'ADC]

BxPC3, NCI-H292, NIH:OVCAR-3, CFPAC-1, FaDu, una linea cellulare umana di adenocarcinoma del polmone Calu-3 (ATCC), ed una linea cellulare umana di cancro dell'ovaio CaOV3 (ATCC) come linee cellulari positive per l'antigene TROP2, ed una linea cellulare umana di cancro del polmone Calu-6 (ATCC) ed una linea cellulare umana di melanoma cutaneo A375 (ATCC) come linee cellulari negative per l'antigene TROP2 sono state utilizzate nella valutazione dell'effetto di inibizione della crescita cellulare di ciascun ADC. BxPC3 ed NCI-H292 sono state preparate con il terreno RPMI 1640 (Gibco) contenente siero fetale bovino al 10% (Moregate Biotech), NIH:OVCAR-3 è stata preparata con il terreno RPMI 1640 contenente siero fetale bovino al 20% e 0,01 mg/ml di insulina (Invitrogen Corp.), CFPAC-1 è stata preparata con terreno di Dulbecco modificato da Iscove (Gibco) contenente siero fetale bovino al 10%, FaDu, Calu-3, e Calu-6 sono state preparate con un terreno minimo essenziale di Eagle (ATCC) contenente siero fetale bovino al 10%, e CaOV3 ed A375 sono state preparate con terreno di Eagle modificato da Dulbecco (Gibco) contenente

siero fetale bovino al 10%, ed hanno ciascuno $2,2 \times 10^6$ cellule/ml. Ciascuna sospensione cellulare è stata seminata a 90 μ l/pozzetto su una micropiastre per coltura cellulare da 96 pozzetti. Il coniugato anticorpo-farmaco (4) o (8) diluito con il terreno RPMI 1640 a 100nM, a 20nM, a 4nM, ad 0,8nM, a 0,16nM, a 0,032nM, oppure a 0,0064nM, od il terreno RPMI 1640 per il confronto vi sono stati aggiunti a 10 μ l/pozzetto, e le cellule sono state sottoposte a coltura in CO₂ al 5% a 37°C per 6 giorni. Dopo la coltura, la micropiastre è stata rimossa dall'incubatore e lasciata riposare a temperatura ambiente per 30 minuti. La soluzione di coltura è stata caricata con una quantità uguale di saggio di vitalità cellulare con luminescenza CellTiter-Glo (Promega) ed agitata per 10 minuti utilizzando un miscelatore per piastre. Dopo la lisi cellulare, è stata misurata l'intensità della luminescenza utilizzando un lettore per piastre.

La velocità di inibizione della crescita cellulare dopo la coltura per 6 giorni è stata calcolata secondo l'equazione seguente:

velocità di inibizione della crescita cellulare (%) = $a/b \times 100$

a: valore medio dai pozzetti arricchiti con il campione dopo la coltura per 6 giorni - valore medio dai pozzetti non arricchiti con il campione all'inizio della coltura

b: valore medio dai pozzetti arricchiti con il terreno dopo la coltura per 6 giorni - valore medio dai pozzetti non arricchiti con il terreno all'inizio della coltura

Il valore di GI₅₀ è stato calcolato secondo l'equazione seguente:

$GI_{50}(nM) = \text{antilog}((50-f) \times (\text{LOG}_{10}(d) - \text{LOG}_{10}(c)) / (f-e) + \text{LOG}_{10}(d))$

c: concentrazione del campione c

d: concentrazione del campione d

e: velocità di inibizione della crescita cellulare alla concentrazione del campione c

f: velocità di inibizione della crescita cellulare alla concentrazione del campione d

Le concentrazioni c e d stabiliscono la relazione $c > d$ incrociando il 50% della velocità di inibizione della crescita cellulare.

I coniugati anticorpo-farmaco (4) e (8) hanno mostrato un effetto inibitorio della crescita cellulare di GI₅₀ < 1 (nM) sulle linee cellulari positive per l'antigene TROP2 BxPC3, NCI-H292, NIH:OVCAR-3, CFPAC-1, FaDu, Calu-3,

e CaOV3. D'altra parte, questi coniugati anticorpo-farmaco non mostrano alcun effetto inibitorio della crescita cellulare (>100 (nM)) sulle linee cellulari negative per l'antigene TROP2 Calu-6 ed A375.

Testo libero dell'elenco delle sequenze

- 5 SEQ ID NO: 1: sequenza nucleotidica di cDNA codificante per una regione variabile della catena pesante dell'anticorpo TINA1
- SEQ ID NO: 2: sequenza amminoacidica della regione variabile della catena pesante dell'anticorpo TINA1
- SEQ ID NO: 3: sequenza nucleotidica di cDNA codificante per una regione variabile della catena leggera dell'anticorpo TINA1
- SEQ ID NO: 4: sequenza amminoacidica della regione variabile della catena leggera dell'anticorpo TINA1
- 10 SEQ ID NO: 5: sequenza nucleotidica codificante per un segnale di secrezione della catena κ umana e per una regione costante della catena κ umana
- SEQ ID NO: 6: sequenza nucleotidica codificante per un segnale di secrezione della catena pesante umana e per una regione costante dell'IgG1 umana
- SEQ ID NO: 7: sequenza nucleotidica di una catena pesante dell'anticorpo cTINA1
- 15 SEQ ID NO: 8: sequenza amminoacidica della catena pesante dell'anticorpo cTINA1
- SEQ ID NO: 9: sequenza nucleotidica di una catena leggera dell'anticorpo cTINA1
- SEQ ID NO: 10: sequenza amminoacidica della catena leggera dell'anticorpo cTINA1
- SEQ ID NO: 11: sequenza nucleotidica di hTINA1-H1
- SEQ ID NO: 12: sequenza amminoacidica di hTINA1-H1
- 20 SEQ ID NO: 13: sequenza nucleotidica di hTINA1-H2
- SEQ ID NO: 14: sequenza amminoacidica di hTINA1-H2
- SEQ ID NO: 15: sequenza nucleotidica di hTINA1-H3
- SEQ ID NO: 16: sequenza amminoacidica di hTINA1-H3
- SEQ ID NO: 17: sequenza nucleotidica di hTINA1-L1
- 25 SEQ ID NO: 18: sequenza amminoacidica di hTINA1-L1

- SEQ ID NO: 19: sequenza nucleotidica di hTINA1-L2
SEQ ID NO: 20: sequenza amminoacidica di hTINA1-L2
SEQ ID NO: 21: sequenza nucleotidica di hTINA1-L3
SEQ ID NO: 22: sequenza amminoacidica di hTINA1-L3
- 5 SEQ ID NO: 23: sequenza amminoacidica di CDRH1 dell'anticorpo TINA1
SEQ ID NO: 24: sequenza amminoacidica di CDRH2 dell'anticorpo TINA1
SEQ ID NO: 25: sequenza amminoacidica di CDRH3 dell'anticorpo TINA1
SEQ ID NO: 26: sequenza amminoacidica di CDRL1 dell'anticorpo TINA1
SEQ ID NO: 27: sequenza amminoacidica di CDRL2 dell'anticorpo TINA1
- 10 SEQ ID NO: 28: sequenza amminoacidica di CDRL3 dell'anticorpo TINA1
SEQ ID NO: 29: sequenza nucleotidica di una catena pesante dell'anticorpo hRS7
SEQ ID NO: 30: sequenza amminoacidica della catena pesante dell'anticorpo hRS7
SEQ ID NO: 31: sequenza nucleotidica di una catena leggera dell'anticorpo hRS7
SEQ ID NO: 32: sequenza amminoacidica della catena leggera dell'anticorpo hRS7
- 15 SEQ ID NO: 33: innesco mG2aVR2
SEQ ID NO: 34: innesco mKVR2
SEQ ID NO: 35: innesco 3.3-F1
SEQ ID NO: 36: innesco 3.3-R1
SEQ ID NO: 37: innesco TINA1H-F
- 20 SEQ ID NO: 38: innesco TINA1H-R
SEQ ID NO: 39: innesco TINA1L-F
SEQ ID NO: 40: innesco TINA1L-R
SEQ ID NO: 41: innesco EG-Inf-F
SEQ ID NO: 42: innesco EG1-Inf-R
- 25 SEQ ID NO: 43: innesco CM-1KF

SEQ ID NO: 44: innesco KCL-Inf-R

SEQ ID NO: 45: sequenza amminoacidica AspGlyGlyPhe

SEQ ID NO: 46: sequenza amminoacidica GluGlyGlyPhe

SEQ ID NO: 47: sequenza amminoacidica GlyGlyPheGly

5 SEQ ID NO: 48: sequenza amminoacidica SerGlyGlyPhe

SEQ ID NO: 49: sequenza amminoacidica LysGlyGlyPhe

SEQ ID NO: 50: sequenza amminoacidica AspGlyGlyPheGly

SEQ ID NO: 51: sequenza amminoacidica GlyGlyPheGlyGly

SEQ ID NO: 52: sequenza amminoacidica AspAspGlyGlyPheGly

10 SEQ ID NO: 53: sequenza amminoacidica LysAspGlyGlyPheGly

SEQ ID NO: 54: sequenza amminoacidica GlyGlyPheGlyGlyGlyPhe

ELENCO DELLE SEQUENZE

<110> Daiichi Sankyo Company, limitata

<120> CONIUGATO ANTICORPO ANTI-TROP2-FARMACO

15 <130> PD20-9007WO

<150> JP2013-267548

<151> 2013-12-25

<160> 44

<170> PatentIn versione 3.5

20 <210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

```

cagatccagt tggatcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaggatc      60
tcttgcaagg cttctgggta tacottcaca actgctggaa tgcagtgggt gcaaaagatg      120
ccaggaaagg gtttgaagtg gattggctgg ataacacccc actctggagt gccaaaatat      180
gcagaagact tcaagggacg gtttgcttc tctttgaaa cctctgccag cactgcatat      240
ttacagataa gcaacotcaa aaatgaggac acgactacgt attctgtgc gagatcgggg      300
ttcggtagta gctactgga cttcgatgtc tggggcgcag ggaccgcggt caccgtctcc      360
tca                                                                           363

```

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 2

```

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1           5           10          15

Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala
20           25           30

Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Ile
35           40           45

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe
50           55           60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

```

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 327

<212> DNA

5 <213> Mus musculus

<400> 3

gacattgtga tgaccagtc tcacaaatc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
atcaactqca aggccagtc ggatgtgagt actgctgtag cctggatca acagaaacca 120
ggacaatctc ctaaactgct gatttactcg gcatactacc gctacaactgg agtccctgat 180
cgcttcaactg gcagtgatc tgggacggct ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240
gaagacctgg cagtttatta ctgtoagcaa cattatatta ctccgctcac gttcggtgct 300
ggaccaagc tggagctgaa acgggct 327

<210> 4

<211> 109

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4


```
gcctcggac totagagcca coatggtgct gcagaccag gtgttcacat cctgctgct 60
gtggatctcc ggcgcgtacg gcgatatcgt gatgattaaa cgtacggtgg ccgccccctc 120
cgtgttcac cccccccct ccgacgagca gctgaagtc ggcaaccgct ccgtggtgtg 180
cctgctgaat aactctacc ccagagagga caaggtgcag tggaaggtgg acaaccct 240
gcagtccggg aactcccagg agagcgtgac cgagcaggac agcaaggaca gcacctacg 300
cctgagcagc accctgacct tgagcaaagc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg 360
cgaggtgacc caccagggcc tgagctccc cgtcaccaag agcttcaaca ggggggagtg 420
ttaggggccc gtttaaacgg gggaggcta 449
```

<210> 6

<211> 1132

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

```

gcctccggac tctagagcca ccatgaaaca cctgtggttc ttctctctgc tgggtggcagc      60
tcccagatgg gtgctgagcc aggtgcaatt gtgcaggcgg ttagctcagc ctccaccaag      120
ggcccaagcg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggcgg cacagccgcc      180
ctgggctgcc tggtaagga ctactcccc gaaccctga ccgtgagctg gaactcaggc      240
gccctgacca gcgcgctgca caccttcccc gctgtcctgc agtcctcagg actctactcc      300
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca ccagaccta catctgcaac      360
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagccaa atcttgtgac      420
aaaactcaca catgcccacc ctgcccagca cctgaactcc tggggggacc ctcagtcttc      480
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc      540
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactgta cgtggacggc      600
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccc cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg      660
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgoaccag gactggtga atggcaagga gtacaagtgc      720
aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatotcca agccaaaggc      780
cagccccggg aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac      840
caggtcagcc tgacctgct ggtcaaagc ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg      900
gagagcaatg gccagcccga gaacaactac aagaccacc ctcccgctgt ggaactccgac      960
ggctccttct tcctotacag caagotcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggcaac     1020
gttttctcat gctccgtgat gcatgaggt ctgcacaacc actacacca gaagagcctc     1080
tcctgtctc ccggcaaatg agatatcggg cccgtttaa cgggggaggc ta              1132

```

<210> 7

<211> 1410

5 <212> DNA

<213> sequenza artificiale

<220>

<223> sequenza nucleotidica della catena pesante dell'anticorpo chimerico murino-umano per TINA1

<400> 7

atgaaacacc tgtggttctt cctcotgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccaag 60
 atccagttgg tgcagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caggatctcc 120
 tgaaggtt ctgggtatac cttcacaact gctggaatgc agtgggtgca aaagatgcca 180
 ggaagggtt tgaagtggat tggctggata aacaccact ctggagtgcc aaaatatgca 240
 gaagacttca agggacgggt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcataatta 300
 cagataagca acctcaaaaa tgaggacacg actacgtatt tctgtgcgag atcgggggttc 360
 ggtagtagct actggtactt cgtgtctggt ggcgcagggc ccgcggtcac cgtcagctca 420
 gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc 480
 ggcacagccg cctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc 540
 tggactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacacottcc ccgctgtcct gcagtcctca 600
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccotcca gcagcttggg caccoagacc 660
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720
 aatcttctg acaaaactca cacatgccc cctgcccag cacctgaact cctgggggga 780
 cctcagttct tcctcttccc cccaaaacc aaggacccc tcatgatctc ccggaccct 840
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900
 tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgac aagacaaagc ccggggagga gcagtacaac 960
 agcacgtacc ggggtggtcag cgtctcacc gtccctgacc aggaactggt gaatggcaag 1020
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaagacc ctcccagccc ccacgagaa aaccatctcc 1080
 aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag 1140
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200
 gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg 1260
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacia ggcaggtgg 1320
 cagcagggca acgtctctc atgctccgtg atgcatgagg ctatgcacaa ccactacacc 1380
 cagaagagcc tctcctgtc tcccggcaaa 1410

<210> 8

<211> 470

<212> PRT

<213> sequenza artificiale

<220>

<223> sequenza amminoacidica della catena pesante dell'anticorpo chimerico murino-umano per TINA1

5 <400> 8

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Ile Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala
65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
115 120 125

Val Trp Gly Ala Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 9

<211> 702

<212> DNA

5 <213> sequenza artificiale

<220>

<223> sequenza nucleotidica della catena leggera dell'anticorpo chimerico murino-umano per TINAI

<400> 9

```

atggtgctgc agaccocagggt gttcatctcc ctgotgotgt ggatctccgg cgcgtacggc      60
gacattgtga tgaccocagtc tcacaaatcc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc      120
atcacctgca aggccagtc ggatgtgagt actgctgtag cctggatca acagaaacca      180
ggacaatctc ctaaactgct gatttactcg gcatcotacc gctacaactgg agtccctgat      240
cgcttcaactg gcagtgatc tgggacggct ttcactttca ccacagcag tqtgcaggct      300
gaagacotgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatatta ctccgctcac gttcgggtgc      360
gggaccaagc tggagctgaa acgggotgtg gccgccccct ccgtgttcat ottcccccc      420
tcgacgagc agotgaagtc cggcacccgc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac      480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaagtg gacaacgcc tgcagtcagg gaaactccag      540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gccagagcag caccctgacc      600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggagt gt      702
  
```

10 <210> 10

<211> 234

<212> PRT

<213> sequenza artificiale

<220>

<223> sequenza amminoacidica della catena leggera dell'anticorpo chimerico murino-umano per TINA1

<400> 10

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

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
 20 25 30

5

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
115 120 125

Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

<210> 11

<211> 1410

<212> DNA

<213> sequenza artificiale

5 <220>

<223> sequenza nucleotidica della catena pesante dell'anticorpo umanizzato per TINAI, tipo H1

<400> 11

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60



gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc 120
tgcaaggcca gcggctacac otttaccacc gccggcatgc agtgggtgcg ccaggctcct 180
ggacagggcc tggaatgatg gggctggatc aacaccaca gcgcgctgcc caaatagccc 240
gaggacttca agggcagagt gaccatcagc gccgacacca gcacctccac agcctacctg 300
cagctgagca gcctgaagtc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag aagcggcttc 360
ggcagcagct actgttactt cgacgtgtgg ggccaggcca ccctcgtgac cgtcagctca 420
gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc 480
ggcacagccg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc 540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcttca 600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccca ccctgccag cacctgaact cctgggggga 780
ccctcagctc tcctottccc cccaaaaccc aaggacacc tcctgatctc ccggaccct 840
gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc caogaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900
tacgtggacg gcgtggaggt goataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaa 960
agcaogtacc ggggtgtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggaactggct gaatggcaag 1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccctcgagaa aacctctcc 1080
aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1140
atgaccaaga accaggctcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200
gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg 1260
ctggactccg acgctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacia gagcaggtgg 1320
cagcagggca acgtottctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacia ccactacacc 1380
cagaagagcc tctccctgto tcccggcaaa 1410

<210> 12

<211> 470

<212> PRT

<213> sequenza artificiale

<220>

<223> sequenza amminoacidica della catena pesante dell'anticorpo umanizzato per TINA1, tipo H1

<400> 12

5 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

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

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 13

<211> 1410

<212> DNA

<213> sequenza artificiale

5 <220>

<223> sequenza nucleotidica della catena pesante dell'anticorpo umanizzato per TINA1, tipo H2

<400> 13

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag      60
gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc      120
tgcaaggcca ggggtacac ctttaccacc gccggcatgc agtgggtgcg ccaggctcct      180
ggcacaggcc tggaatggat gggctggatc aacaccaca gcggcgtgcc caaatacgcc      240
gaggacttca agggcagagt gaccatcagc ctggacacca gcacotccac cgcctacctg      300
cagctgagca gcctgaagtc cgaggacacc gccgtgtact aotgcgccag aagcggcttc      360
ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca cctcgtgac cgtcagctca      420
gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc      480
ggcacagccg ccttgggtg cctggtoaag gactacttec ccgaaccctg gaccgtgagc      540
tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgtgtcct gcagtcctca      600
ggaotctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc      720
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca cctgcccag cacctgaact cctgggggga      780
cctcagctct tcctcttccc cccaaaaacc aaggacacc ccatgatctc ccggacccct      840
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaa      960
agcacgtacc ggggtgtoag cgtcotoacc gtctctgacc aggaotggct gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc     1080
aaagccaaag gccagcccgg ggaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag     1140
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     1200
gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg     1260
ctggactcgg acggtcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggaaa gagcaggtgg     1320
cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc     1380
cagaagagcc tctcctgtc tcccggcaaa     1410
  
```

<210> 14

<211> 470

<212> PRT

<213> sequenza artificiale

<220>

<223> sequenza amminoacidica della catena pesante dell'anticorpo umanizzato per TINA1, tipo H2

5 <400> 14

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1			5					10						15	

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

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

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala
 65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 15

<211> 1410

<212> DNA

<213> sequenza artificiale

5 <220>

<223> sequenza nucleotidica della catena pesante dell'anticorpo umanizzato per TINA1, tipo H3

<400> 15

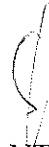
```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag      60
atccagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaccocg gcgagagcgt gaaggtgtcc      120
tgcaaggcca gcggotacac ctttaccacc gccggcatgc agtgggtgca gcagatgcct      180
ggcaagggcc tggaatggat gggctggatc aacaccacca gcggcgtgcc caaatacgcc      240
gaggacttca agggcagagt gaccttcagc ctggacacca gcacotccac cgcctacctg      300
cagctgagca gcctgaagtc cgaggacacc gccgtgtaet actgcgccag aagcggotto      360
ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca ccctcgtgac cgtcagotca      420
gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc      480
ggcacagccg ccctgggctg cotggtaag gactacttcc ccgaaccocg gaccgtgagc      540
tggaactcag gcgccotgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca      600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagottggg caccagacc      660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc      720
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccctgcccaag cacctgaact cctgggggga      780
ccctcagctt tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct      840
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac      960
agcaactacc ggggtggtcag cgtcotcacc gtccctgcacc aggaotggct gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc     1080
aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag     1140
atgaccaaga accaggtcag cotgacctgc ctggtaaaag gcttotatcc cagcgacatc     1200
gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg     1260
ctggactccg acggtcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg     1320
cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc     1380
cagaagagcc tctccctgto tcccggcaaa     1410

```

<210> 16

<211> 470



<212> PRT

<213> sequenza artificiale

<220>

<223> sequenza amminoacidica della catena pesante dell'anticorpo umanizzato per TINA1, tipo H3

5 <400> 16

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1				5					10					15	

Val Leu Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

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

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala
 65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

260	265	270
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp 275 280 285		
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly 290 295 300		
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn 305 310 315 320		
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp 325 330 335		
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro 340 345 350		
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu 355 360 365		
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn 370 375 380		
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 385 390 395 400		
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr 405 410 415		
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys 420 425 430		
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys 435 440 445		
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 450 455 460		
Ser Leu Ser Pro Gly Lys 465 470		

<210> 17

<211> 702

<212> DNA

<213> sequenza artificiale

5 <220>

<223> sequenza nucleotidica della catena leggera dell'anticorpo umanizzato per TINA1, tipo L1

<400> 17

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacgga	60
gacatccaga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	120
atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc acagccgtgg cctggtatca gcagaagcct	180
ggcaaggccc ocaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgccacgc	240
agatthttctg gcagcggctc cggcaaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc	300
gaggactctg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca ccccctgac ctttggccag	360
ggcaccaaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgcccctt ccgtgttcat attcccccc	420
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac	480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgcc tgcagtcgg gaactcccag	540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc	600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggagt gt	702

<210> 18

10 <211> 234

<212> PRT

<213> sequenza artificiale

<220>

<223> sequenza amminoacidica della catena leggera dell'anticorpo umanizzato per TINA1, tipo L1

<400> 18

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

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

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr

100	105	110
Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
115	120	125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
130	135	140
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
145	150	155
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
165	170	175
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
180	185	190
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
195	200	205
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
210	215	220
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	

<210> 19

<211> 702

<212> DNA

5 <213> sequenza artificiale

<220>

<223> sequenza nucleotidica della catena leggera dell'anticorpo umanizzato per TINA1, tipo L2

§

<400> 19

```
atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc      60
gacatcgtga tgaccagag ccotagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc      120
atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc acagccgtgg cctggtatca gcagaagcct      180
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgccagc      240
agatthctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc      300
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac ctttggccag      360
ggcaccaago tggaaatcaa gcgtacggtg gccgcccctc ccgtgttcat cttccccccc      420
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac      480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgcc tgcagtccgg gaactccag      540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcaactaca gcctgagcag caccctgacc      600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggagt gt                          702
```

<210> 20

5 <211> 234

<212> PRT

<213> sequenza artificiale

<220>

<223> sequenza amminoacidica della catena leggera dell'anticorpo umanizzato per TINA1, tipo L2

10 <400> 20

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

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

§

			180						185						190
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
		195					200					205			
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
	210					215					220				
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
225					230										

<210> 21

<211> 702

<212> DNA

5 <213> sequenza artificiale

<220>

<223> sequenza nucleotidica della catena leggera dell'anticorpo umanizzato per TINA1, tipo L3

<400> 21

```
atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacgga      60
gacatcgtga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc      120
atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc acagccgtgg cctggtatca gcagaagccc      180
ggcaagcagc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgcccagc      240
agatthctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc      300
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac ctttggccag      360
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgccccct ccgtgttcat ottccccccc      420
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taactctac      480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggty gacaaccgcc tgcagtccgg gaactoccag      540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc      600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggagt gt                          702
```

<210> 22

<211> 234

<212> PRT

5 <213> sequenza artificiale

<220>

<223> sequenza amminoacidica della catena leggera dell'anticorpo umanizzato per TINAI, tipo L3

<400> 22

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

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gln Pro
 50 55 60

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
 100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 23

Thr Ala Gly Met Gln
1 5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 24

Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 12

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 26

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus


```

atgaaacacc tgtggttctt cctcotgctg gtggcagctc ccagatgggt gotgagccag      60
gtgcagctgc agcagagcgg cagcagctg aagaagcctg gcgccagcgt caaggtgtcc      120
tgcaaggcca gcggctacac cttcaccaac tacggcatga actgggtgaa gcaggcccca      180
ggccagggcc tgaagtggat ggctggatc aacacctaca ccggcgagcc cacctacacc      240
gacgacttca agggccggtt cgccttcagc ctggacacca gcctgagcac cgcctacctg      300
cagatcagca gcctgaagga cgacgatacc gocgtgtact tetgcccag agggcgcttc      360
ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccaggcca gcctggtgac cgtgagctca      420
gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcacctc cctccaagag cacctctgga      480
ggcacagccg ccctgggtg cotggtcaag gactaotcc ccgaaccctg gaccgtgagc      540
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgtgtcct gcagtcctca      600
ggaactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      660
tacatctgca acgtgaatca caagcccaga aacaccaagg tggacaagag agttgagccc      720
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccctgcccag caactgaact cctgggggga      780
ccctcagtct tectcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct      840
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaaa      960
agcacgtacc ggggtgtcag cgtctcacc gtctgcacc aggactgget gaatggcaag      1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaagacc ctcccagccc ccctcgagaa aaccatctcc      1080
aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag      1140
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      1200
gcctggaggt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg      1260
ctggactccg acggtctctt ctctctctac agcaagctca ccgtggaaa gagcaggtgg      1320
cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc      1380
cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa      1410

```

<210> 30

<211> 470

)

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys
20 25 30

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

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 31

<211> 702

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5 <400> 31

```

atggtgctgc agaccacaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc      60
gatatccagc tgaccacagag ccccacgagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgtcc      120
atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc attgccgtgg cctggtatca gcagaagccc      180
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagotacc ggtacaaccgg cgtgcccgac      240
agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc      300
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca ccccctgac ctccggagcc      360
ggcaccacag tggaatcaa gctacgggtg gccgccccct ccgtgttcat ctccccccc      420
tcgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tcctggtgt gcctgctgaa taacttctac      480
cccagagagg ocaaggtgca gtggaagggt gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag      540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc      600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccac gagcttcaac aggggggagt gt                          702

```

<210> 32

<211> 234

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 32

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

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

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Val Ser Ile Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 33

<211> 30

<212> DNA

5 <213> sequenza artificiale

<220>

<223> sequenza nucleotidica dell'innesco mG2aVR2

<400> 33

agagttccag gtcaaggta ctggetcagg 30

10 <210> 34

<211> 30

<212> DNA
<213> sequenza artificiale
<220>
<223> sequenza nucleotidica dell'innesco mKVR2
5 <400> 34
agtccaactg ttcaggacgc cattttgtcg 30
<210> 35
<211> 30
<212> DNA
10 <213> sequenza artificiale
<220>
<223> sequenza nucleotidica dell'innesco 3.3-F1
<400> 35
tataccgtcg acctctagct agagcttgge 30
15 <210> 36
<211> 30
<212> DNA
<213> sequenza artificiale
<220>
20 <223> sequenza nucleotidica dell'innesco 3.3-R1
<400> 36
gctatggcag ggctgcccgc cccgacgttg 30
<210> 37
<211> 47
25 <212> DNA

<213> sequenza artificiale
<220>
<223> sequenza nucleotidica dell'innesco TINA1H-F
<400> 37
5 ccagatgggt gctgagccag atccagttgg tgcagtctgg acctgag 47
<210> 38
<211> 48
<212> DNA
<213> sequenza artificiale
10 <220>
<223> sequenza nucleotidica dell'innesco TINA1H-R
<400> 38
cttggggag gctgagctga cggtagccgc ggtccctgcg ccccagac 48
<210> 39
15 <211> 48
<212> DNA
<213> sequenza artificiale
<220>
<223> sequenza nucleotidica dell'innesco TINA1L-F
20 <400> 39
atctccggcg cgtacggcga cattgtgatg acccagtcac acaaattc 48
<210> 40
<211> 45
<212> DNA
25 <213> sequenza artificiale

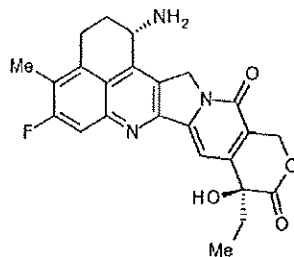
<220>
<223> sequenza nucleotidica dell'innesco TINA1L-R
<400> 40
ggagggggcg gccacagccc gttcagctc cagcttggtc ccagc 45
5 <210> 41
<211> 22
<212> DNA
<213> sequenza artificiale
<220>
10 <223> sequenza nucleotidica dell'innesco EG-Inf-F
<400> 41
agctcccaga tgggtgctga gc 22
<210> 42
<211> 22
15 <212> DNA
<213> sequenza artificiale
<220>
<223> sequenza nucleotidica dell'innesco EG1-Inf-R
<400> 42
20 gggcccttg tggaggctga gc 22
<210> 43
<211> 24
<212> DNA
<213> sequenza artificiale
25 <220>



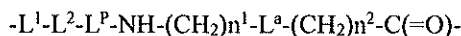
<223> sequenza nucleotidica dell'innesco CM-1KF
<400> 43
ctgtggatct ccggcgcgta cggc 24
<210> 44
5 <211> 21
<212> DNA
<213> sequenza artificiale
<220>
<223> sequenza nucleotidica dell'innesco KCL-Inf-R
10 <400> 44
ggagggggcg gccacgtac g 21

RIVENDICAZIONI

1. Un coniugato anticorpo-farmaco in cui un composto antitumorale rappresentato dalla seguente formula:



è coniugato ad un anticorpo anti-TROP2 mediante un legame tioetere che si forma ad un gruppo funzionale per un legame disolfuro presente in una parte cerniera dell'anticorpo anti-TROP2 attraverso un gruppo di collegamento avente una struttura rappresentata dalla seguente formula:



in cui l'anticorpo anti-TROP2 è connesso al terminale di L^1 , il composto antitumorale è connesso al gruppo carbonile del gruppo funzionale $-(CH_2)n^2-C(=O)-$ con l'atomo di azoto del gruppo ammino in posizione 1 come posizione di

10 connessione,

in cui

n^1 rappresenta un numero intero da 0 a 6,

n^2 rappresenta un numero intero da 0 a 5,

L^1 rappresenta $-(succinimid-3-il-N)-(CH_2)n^3-C(=O)-$,

15 in cui n^3 rappresenta un numero intero da 2 ad 8,

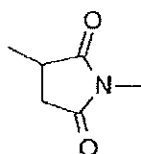
L^2 rappresenta $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ od un legame singolo,

in cui n^4 rappresenta un numero intero da 1 a 6,

L^P rappresenta un residuo tetrapeptidico di $-GGFG-$,

L^a rappresenta $-O-$ od un legame singolo, e

20 $-(succinimid-3-il-N)-$ ha una struttura rappresentata dalla seguente formula:



che è connessa all'anticorpo anti-TROP2 nella sua posizione 3 ed è connessa ad un gruppo metilene nella struttura di collegamento contenente questa struttura sull'atomo di azoto in posizione 1,

in cui l'anticorpo anti-TROP2 comprende CDRH1 composta dalla sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 23, CDRH2 composta dalla sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 24 e CDRH3 composta dalla sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 25 nella sua regione variabile della catena pesante e CDRL1 composta dalla sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 26, CDRL2 composta dalla sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 27 e CDRL3 composta dalla sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 28 nella sua regione variabile della catena leggera.

2. Coniugato anticorpo-farmaco secondo la rivendicazione 1, in cui il gruppo funzionale strutturale di collegamento del farmaco avente un farmaco connesso ad $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)^{n^1}-L^A-(CH_2)^{n^2}-C(=O)-$ è una struttura di collegamento del farmaco scelta dal seguente gruppo:

-(succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

-(succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

-(succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

-(succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

-(succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

-(succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

-(succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

-(succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

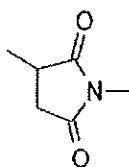
-(succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

-(succinimid-3-il-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$

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

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

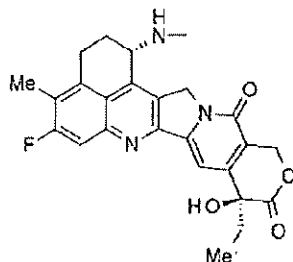
in cui $\text{-(succinimid-3-il-N)-}$ ha una struttura rappresentata dalla seguente formula:



5

che è connessa all'anticorpo anti-TROP2 nella sua posizione 3 ed è connessa ad un gruppo metilene nella struttura di collegamento contenente questa struttura sull'atomo di azoto in posizione 1,

-(NH-DX) rappresenta un gruppo rappresentato dalla seguente formula:



10 in cui l'atomo di azoto del gruppo ammino in posizione 1 è una posizione di connessione, e

-GGFG- rappresenta un residuo tetrapeptidico di -Gly-Gly-Phe-Gly- .

3. Coniugato anticorpo-farmaco secondo la rivendicazione 2, in cui il gruppo funzionale strutturale di collegamento del farmaco è una struttura di collegamento del farmaco scelta dal seguente gruppo: $\text{-(succinimid-3-il-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,

15 $\text{-(succinimid-3-il-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$, e

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

4. Coniugato anticorpo-farmaco secondo la rivendicazione 3, in cui il gruppo funzionale strutturale di collegamento del farmaco è: $-(\text{succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$.
5. Coniugato anticorpo-farmaco secondo la rivendicazione 3, in cui il gruppo funzionale strutturale di collegamento del farmaco è: $-(\text{succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$.
- 5 6. Coniugato anticorpo-farmaco secondo la rivendicazione 3, in cui il gruppo funzionale strutturale di collegamento del farmaco è: $-(\text{succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$.
7. Coniugato anticorpo-farmaco secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui l'anticorpo anti-TROP2 comprende una catena pesante ed una catena leggera scelte nel gruppo;
- 10 una regione variabile della catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 140 della SEQ ID NO: 12 ed una regione variabile della catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 129 della SEQ ID NO: 18,
- una regione variabile della catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 140 della SEQ ID NO: 14 ed una regione variabile della catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a
- 15 129 della SEQ ID NO: 18,
- una regione variabile della catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 140 della SEQ ID NO: 14 ed una regione variabile della catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 129 della SEQ ID NO: 20, ed
- una regione variabile della catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 140 della SEQ
- 20 ID NO: 16 ed una regione variabile della catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 129 della SEQ ID NO: 22.
8. Coniugato anticorpo-farmaco secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui l'anticorpo anti-TROP2 comprende una catena pesante ed una catena leggera scelte nel gruppo;
- una catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 470 della SEQ ID NO: 12 ed una
- 25 catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 234 della SEQ ID NO: 18, una catena

- pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 470 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 234 della SEQ ID NO: 18, una catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 470 della SEQ ID NO: 14 ed una catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 234 della SEQ ID NO: 20, ed
- 5 una catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 470 della SEQ ID NO: 16 ed una catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 234 della SEQ ID NO: 22.
9. Coniugato anticorpo-farmaco secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui l'anticorpo anti-TROP2 comprende una regione variabile della catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 140 della SEQ ID NO: 12 ed una regione variabile della catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle
- 10 posizioni da 21 a 129 della SEQ ID NO: 18.
10. Coniugato anticorpo-farmaco secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui l'anticorpo anti-TROP2 comprende una catena pesante composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 20 a 470 della SEQ ID NO: 12 ed una catena leggera composta dalla sequenza amminoacidica delle posizioni da 21 a 234 della SEQ ID NO: 18.
11. Coniugato anticorpo-farmaco secondo la rivendicazione 8, in cui l'anticorpo anti-TROP2 manca di un residuo
- 15 di lisina all'estremità carbossiterminale della catena pesante.
12. Coniugato anticorpo-farmaco secondo la rivendicazione 10, in cui l'anticorpo anti-TROP2 manca di un residuo di lisina all'estremità carbossiterminale della catena pesante.
13. Coniugato anticorpo-farmaco secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui un numero medio di unità della struttura di collegamento del farmaco scelta coniugate per anticorpo è in un intervallo da 2 ad 8.
- 20 14. Coniugato anticorpo-farmaco secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui un numero medio di unità della struttura di collegamento del farmaco scelta coniugate per anticorpo è in un intervallo da 3 ad 8.
15. Un farmaco contenente il coniugato anticorpo-farmaco secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, un suo sale, od un suo idrato.
- 25 16. Un farmaco antitumorale e/o un farmaco anticancro contenenti il coniugato anticorpo-farmaco secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, un loro sale, od un loro idrato.

17. Farmaco antitumorale e/o farmaco anticancro secondo la rivendicazione 16, per l'uso in un metodo di trattamento del cancro del polmone, del cancro del rene, del cancro dell'urotelio, del cancro del colon-retto, del cancro della prostata, del glioblastoma multiforme, del cancro dell'ovaio, del cancro del pancreas, del cancro della mammella, del melanoma, del cancro del fegato, del cancro della vescica, del cancro dello stomaco, del carcinoma del collo dell'utero, del cancro della testa e del collo, o del cancro dell'esofago.

18. Una composizione farmaceutica comprendente il coniugato anticorpo-farmaco secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, un suo sale, od un suo idrato come principio attivo, ed un componente della formulazione farmaceuticamente accettabile.

19. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 18, per l'uso in un metodo di trattamento del cancro del polmone, del cancro del rene, del cancro dell'urotelio, del cancro del colon-retto, del cancro della prostata, del glioblastoma multiforme, del cancro dell'ovaio, del cancro del pancreas, del cancro della mammella, del melanoma, del cancro del fegato, del cancro della vescica, del cancro dello stomaco, del carcinoma del collo dell'utero, del cancro della testa e del collo, o del cancro dell'esofago.

Il sottoscritto dichiara che la presente
traduzione è conforme al testo originale.

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

FIGURA 1

SEQ ID NO: 7: sequenza nucleotidica della catena pesante dell'anticorpo per cTINA1

```
atgaaaacacctggtgttcttccctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccagatccag  
ttggtgcagctctggaacctgagctgaagaagcctggaqagacagtcaggatctcctgcaaggcttct  
gggtataccttcacaactgctggaatgcagtggtgcaaaagatgccaggaaaggggttgaagtgg  
attggctggataaacaccacctctggagtgccaaaatgcaagaagactccaagggaagggtttgcc  
tctctcttggaaacctctgccagcactgcatattacaqataagcaacctcaaaaatgaggacaag  
actacgtattctctgtagagatcgggggttcggtagtagctactggtagctctgagtgctgggggca  
gggaccggggtcaccgtcagctcagcctcccacaaggccccaggctctccccctggcaccctcc  
tccaagagcacctctggcggcacagccgcccctgggctgctggtcaaggactacttcccgaaccc  
gtgaccgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcgggctgcaacacctccccctgctcctgag  
tccctcagactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagcttgggccccagacc  
taactctgcaactgaaatcacaagcccagcaacccaaggtggacaagagagttgagccaaaatct  
tgtgacaaaactcagacatgccaccctgcccagcactgaaactcctggggggaccctcagctctc  
ctctccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaacccctgaggtcacaatgctggtg  
gtggaactgagccagaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggaaggcgtggaggtgcat  
aatgcaagcaaaagcccccgggaggagcaagcaaacagcagctaccgggtggtcagcctcctcacc  
gtcctgcaacaggactgctgaaatggcaaggagtaacaagtgcaaggtctcccaacaagccctccc  
gcccctcagagaaaacctctccaaagccaaagccagcccccgggaacccaggtgtacacctg  
ccccctccccggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgctcaaggcttctat  
cccagcagatctgctggtgagtgaggagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccacct  
cccgtgctggactccgacggctccttcttctctcagcaagctcaccgtggacaagagcaggtg  
cagcagggcaacgctctctcctgctccgtgatgcatgaggtctgcaacaacctacaccagaag  
agcctctcccctgtctcccqcaaa
```

sequenza segnale (da 1 a 57), regione variabile (da 58 a 420), regione costante (da 421 a 1410)

SEQ ID NO: 8: sequenza amminoacidica della catena pesante dell'anticorpo per cTINA1

```
MKHLMPFLLVAAPRIVLSQIQLVDSGPELKKPGETVRIISCKASGYFTTAGMQRVQMPGRGLKNIGWINT  
HSGVPKYAEDEKGRFAFSLKTSASTAYLQISNLKNEDTTYFCARSGFGSSYWFQVWAGTAVIVSSASTK  
GPSVFPPLAPSSKSTSGGTALGCLVKQYFPEFVTVSANSGLTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSL  
GTQTYICHVNHKPSNTKVEKRVKPKSCDKTHTCPDPAPELLGGPSVLEFPPKPRQTLIMISRTPEVTCVVVD  
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPFEQYNSYRQVSVLTVLHQDWLNGKEYKCRVSNKALPAPIERTLS  
KAKGQPREPQVYTLPPSRPEPTKRVQVSLTCLVKGFFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
LIVDKSRHQQGNVFCSSVHHEALHNHYTQKSLSLSPGR
```

sequenza segnale (da 1 a 19), regione variabile (da 20 a 140), regione costante (da 141 a 470)

FIGURA 2

SEQ ID NO: 9: sequenza nucleotidica della catena leggera dell'anticorpo per cTINA1

atggtgctgcagaccagggttcatctccctgctgctgtggatctccggcggctacggcgaactt
gtgatgaccagctctcaaaatleatgtccacatcaagaggagacagggtcagcatcacctgcaag
gccagtcaggatgtgagtactgctgtagcctggtatcaacagaaaccaggacaatctcctaaactg
ctgattlaetcggcatectaccgctaeactggagtcctgatcctleactggcagtggtatctggg
acggcttcaacttccaccatcagcagtgctcaggtgaaacctggcagttattactgtcagcaa
caatlatactccgctcacgttcgggtctgggaccaagctggagctgaaacgggctgtgccgcc
ccctccgtgtleatctccccccctccgacgagcagctgaagtcggcaccgctccgtggtgtgc
ctgtgaataactctaccacagagagggccaaaggtgcaqtggaagtggaacaacgccctgcagtc
gggaactcccaggaagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcaactacagcctgagcagcacc
ctgacctgagcaaaqccgactacgagaagcaaaaggtgtacgctgagaggtgacccaccagggc
ctgagctccccgtcaccaaagcttcaacagggggagtg

sequenza segnale (da 1 a 60), regione variabile (da 61 a 387), regione costante (da 388 a 702)

SEQ ID NO: 10: sequenza amminoacidica della catena leggera dell'anticorpo per cTINA1

MVLQTVFESLLLWLSGAYGDI VHTQSHKFMSTSVGDRVSTCKASQSVSTAVAHYQQRFGQSPKLLIYSAS
YRYFGVPRFPGSGSGTAFTFTLSSVQAEDLAVYYCQHVTPLTFGAGTKLELKRVAASVFLFPSPDEQ
LKRGTASVVCLLHNFYPREAKVQWRVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLETLISKAQYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

sequenza segnale (da 1 a 20), regione variabile (da 21 a 129), regione costante (da 130 a 234)

TAVOLA IV

FIGURA 4

SEQ ID NO: 13: sequenza nucleotidica di hTINA1-H2

```
atgaaacacctgtggtctctctctgctggcagctccagatgggtgctgagccaggtgcaactggtg  
cagctctggcgccgaagtgaagaacccagggccagcgtgaaaggtgctctgcaaggccagggctacacctctt  
accaccgcccggcattgagctgggtgcccaggtctctggacagggccctggaaaggatgggtggatcaacacc  
ccacagcggcgtgcccaaatagccgaggaactcaagggcagagtgaccatcagctggacaccagcaactcc  
accgctaccctcagctgagcagcctgaaagctccgaggaaccggccgctgctactgcccagaaggcgtctc  
ggcagcagctactggtactctgacgctggtgggcccagggcaacctcgtgacctgactcagctccaccag  
ggcccaggctctctccctggcaccctctccaagagcaacctctggcggccacagccgctctgggtgctctg  
gtcaaggactactctcccgaaaccgtgacgctgagctggaaactcagggccctgaccagcggctgcaacc  
tctcccgctgctctgagctctcaggaactctactccctcagcagcgtggtgacctgacctccagcagctg  
ggcaccagacctactctgcaagtgaaatcaaacgccagcaaccacaaqgtggacaaagaggttgagccc  
aaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaacctgcccagcactgaaactctggggggccctcagctctc  
ctctctcccccacaaaccaggaaccctcatgatctccggaccctgaggtcaccatgctggtggtggac  
gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtcagtgagcggctggaggtgcaataatgccaaagca  
aagcccggggaggagcagtaaacacagcagctaccgggtggtcagcctctccagctctgcccaggaactgg  
ctgaaatggcaaggagtaacaagtcaaggtctcaacaaagccctccagcccccacaggaacacatctcc  
aaagccaaagggccagcccgggancacaggtgtaacacctgcccctccgggagagatgaccaagaac  
caqgtcagcctgacctgctggtcaaggtctctatccagcagcctcagcgtggagtgaggagcaatggc  
cagcccgagaacaantacaagaccacctcccgctgctggaactccagcggctctctctctctacagcaag  
ctcaccgtggacaagcagggggcagcagggcaacgtctctctatgctccgctgactgcatgaggtctgca  
aaccactacacccagaagcctctcctgtctccggcaaa
```

sequenza segnale (da 1 a 57), regione variabile (da 58 a 420), regione costante (da 421 a 1410)

SEQ ID NO: 14: sequenza amminoacidica di hTINA1-H2

```
MKHLHFFLLVMFFNVLSQVQLVQSGAEVKKPQASVKVSKASGVTETTSKQVFRQAFGCGLEWMTWINT  
HSGVFRVARDPRKRVTIISLDTSTSTAYLDLSSLKSEDTAVVYCARSGPGSSYHYFDWQGGTIVFVSSASTK  
GESVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVRFDFPEPVTUSMNSGALTSQVHTFFAVLQSSGLYSLSVVTVPSL  
GTQTYICNVHFKPSNTKVKRVEPKSCQKTHFCPCPAVELLGGPSVLPFRKPKDTLMSKRVSTVTCWVD  
VSHRDFEVKFNWYVGVVHNAKTRPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCRVSNKALPAPLKTIS  
KAKQCPREPPQVYTIIPSRREHTKIKVSLTCLVKGTFPSDI AVEVESNGQPKRKYKTFPVILSDGSPFLYSK  
LTVKSRWQCGNVFSCVMHRAIHNHYTQKSLSLSPCK
```

sequenza segnale (da 1 a 19), regione variabile (da 20 a 140), regione costante (da 141 a 470)

FIGURA 6

SEQ ID NO: 17: sequenza nucleotidica di hTINA1-L1

atcgggtgctgcagaccacaggtgttcaatctccctgctgctgtggatctccggcgcttaaggcgcacatccagatg
accacagagccctagaacgctcagcgcacagcgtgggcgacagagtgaccatcaatgcaaggccagccagga
gtgtccacagccgtggcctggtatcagcaayagcctggcaaggcccccaagctgctgctctacagccagc
tacgggtacacccggcgtgccacagcagattttctggccggcgtccggccacgactccacctgacaatcagc
agcctgcagccagagcacttcgccgtgtaactactgccacagcagcactacatcacccccctgaccttggccag
ggcaccagcctggaaatcaaggctacggtggccgccccctccgtgttcaatctcccccctccagcagcag
ctgaagtcggccaccgctccgtggtgtgctctgctgaataactctaccaccagagggcccaagggtcagtgq
aaggtagcaaacgcccctgcagtcgggaaetcccaggagagcgtgaccagcaggaagcaaggaaagcacc
tacagcctgagcagcaccctgacctgagcaagccagcactatgagaaagcacaagggtgtaagcctgcagaggtg
accacaccagggcctgagctccccgtcaccagagcttcaacagggggagtggt
sequenza segnale (da 1 a 60), regione variabile (da 61 a 387), regione costante (da 388 a 702)

SEQ ID NO: 18: sequenza amminoacidica di hTINA1-L1

MYLQIQVFISLLLMISGAYUDIQTQSPSSLSASVGRVITICRASQDVSTAVANVQCRKGRAPKLLIYQAS
YRYTGVPFRFSGSGSSTFTLTSSLQPEDFAVYVQQHYITPLTIGQXTNLEIKRIVAAPSVPIFFPSDEQ
LKSGTASVVCLLNHFYPAKAVQMKVDNAIQSGHQQESVYFQDSKQSTYSISSPLTISKADYFKHKVYACRV
TRQGLSFPYTKSENRCEC

sequenza segnale (da 1 a 20), regione variabile (da 21 a 129), regione costante (da 130 a 234)



FIGURA 7

SEQ ID NO: 19: sequenza nucleotidica di hTINA1-L2

atggtgctgcaagaccaggtgtteatctccctgctgctgtggsctctcggcggcgttaeggcgacatcgtgatg
 acccagagccctagcagcctgagcgcacagcgtggcgacagagtgaccatcacatgcaaggccagccaggac
 gttgccacagccgtggcctggatcagcagaagcctggcaaggcccccagctgctgatctacagcgcagc
 tacoggtacaacggcgtgcccagcagattttctggcagcggctccggcaccgacltcaacctgacaaacagc
 agcctgcagcccgaggacttcgcccgtgtaactctgcajcajcaatcacatcaccctcctgacctttggccag
 ggcaccaagctggaaateaaagctacgggtggcggcccccctccgtgtteatctcccccctccgacgagcag
 ctgaagtccggcaccgctccgtggtgtgctgctgaaataaactctaccccagagagggccaagtgagtg
 aaggtggacaacgcccctgcagtcgggaaactccaggagagcgtgaccgagcaggaacagcaaggacagcacc
 taccagcctgagcagaccctgaccctgagcaaaagccgactacgagaagcaaaaggtgtaccgctgcaggtg
 acccaccaggccctgagctcccccgtcaaccaagcttcaacagggggagtgct

sequenza segnale (da 1 a 60), regione variabile (da 61 a 387), regione costante (da 388 a 702)

SEQ ID NO: 20: sequenza amminoacidica di hTINA1-L2

MVLTQVFISLLLWISGAYCDIVHMQSPSSLSASVGRVITCRASQDVSTAVANYQQKPKRPRLLTYSAS
 VRYTGVPGRHSGGSGTDFLLTISLQPEDNAVYYCQOHYITELTFCCGTKLEIKRTVAAPSVFIFFPSDEQ
 LESGTASVVCLLNNFYPRKAVQKVINALQSGNSGHSVTQDSKOSTYSLSSITLISEADYERHKVYACEV
 TRQGLSEPVTKSENRGEC

sequenza segnale (da 1 a 20), regione variabile (da 21 a 129), regione costante (da 130 a 234)

FIGURA 8

SEQ ID NO: 21: sequenza nucleotidica di hTINA1-L3

Atggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcggtaacggcgacatcgtgshg
accacagaccctagcagccctgagcgcacagcglggcgacagagtqacatccacatgcaaggccagccagpac
gtgtccacagccgtggcctggatcagcagaagcccggaagcagcccaagctgctgactacagccagcagc
taccggtaacacggcgtgcccagcagattttctggcagggctccggcaccgacttccacctgacactcagc
agcctgcagcccgaggacttcgcccgtgactactgcccagcagcactacatcccccctgacctttggccag
ggcaccagctggaaatcagcgtacgggtgcccgcacctccgtgttcattctcccccctccgacagcag
ctgaagtcggcaccgctccgctggctgctgctgcaataacttctaccosagagggccaaaggtgcccgtgg
aaggtggacacgcccctgcagtcgggaaactccaggagagcgtgacagcagaggaagcaaggacagcacc
taccgctgagcagaccctgacctgagcaagccgactacagagaagccaaaggtgttcgctgcccgtg
accacccagggcctgagctcccccctaccagagcttcaacaggggggaggt
sequenza segnale (da 1 a 60), regione variabile (da 61 a 387), regione costante (da 388 a 702)

SEQ ID NO: 22: sequenza amminoacidica di hTINA1-L3

MVLDLQVVFISLLLMISGAYGDIWNTQSFSSLSASVGRVFTICKASQDVSTAVARVQKPKQPKLLIYSAS
YRYTGVPBRFSGGSGTQFTLTYSLSQFEDFVYYCQCHYITPLTPOGGTKLEIERTVAAPSVFIFFPSGQ
LRSQYASVVCLLNNFYIFPAKVQKVDNALQSCNSQESVTEQESKDSYLSSTLTLSKADYERHKVYACKV
THQGLSSEVTKSPNRGEC
sequenza segnale (da 1 a 20), regione variabile (da 21 a 129), regione costante (da 130 a 234)

FIGURA 9

SEQ ID NO: 23: sequenza amminoacidica di CDRH1 dell'anticorpo per TINA1
TAGMQ

SEQ ID NO: 24: sequenza amminoacidica di CDRH2 dell'anticorpo per TINA1
WINTHSGVPKYAEDFKG

SEQ ID NO: 25: sequenza amminoacidica di CDRH3 dell'anticorpo per TINA1
SGFGSSYWYFDV

SEQ ID NO: 26: sequenza amminoacidica di CDRL1 dell'anticorpo per TINA1
KASQDVSTAVA

SEQ ID NO: 27: sequenza amminoacidica di CDRL2 dell'anticorpo per TINA1
SASYRYT

SEQ ID NO: 28: sequenza amminoacidica di CDRL3 dell'anticorpo per TINA1
QQHYITPLT

FIGURA 10

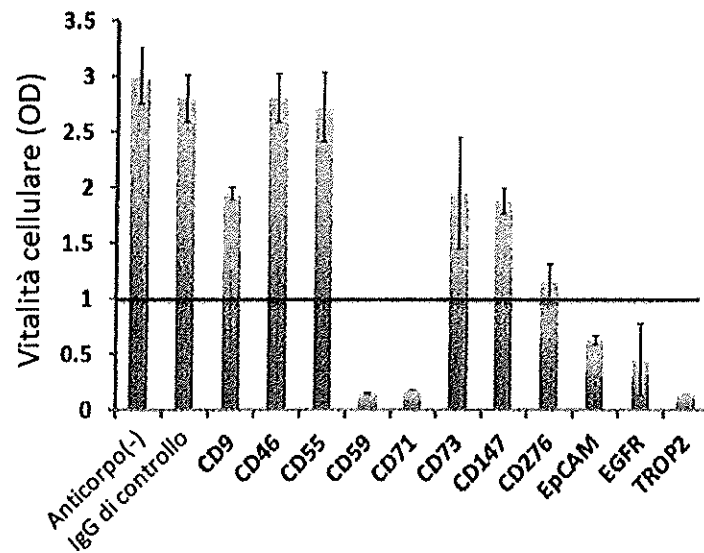


FIGURA 11

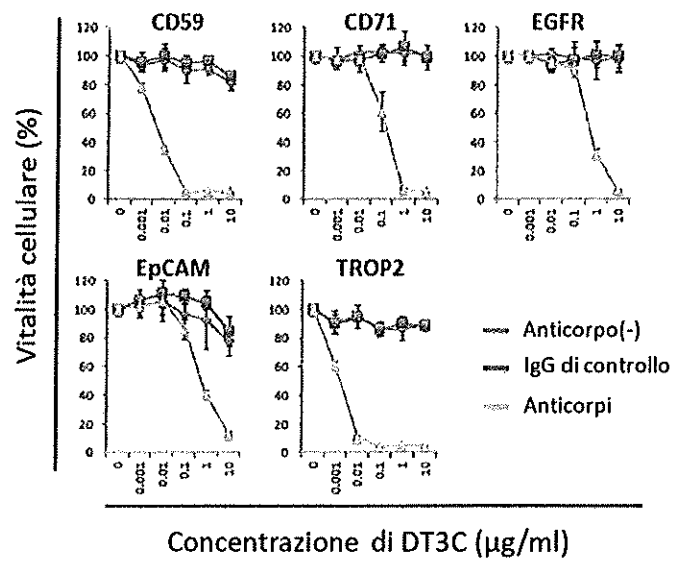


FIGURA 12

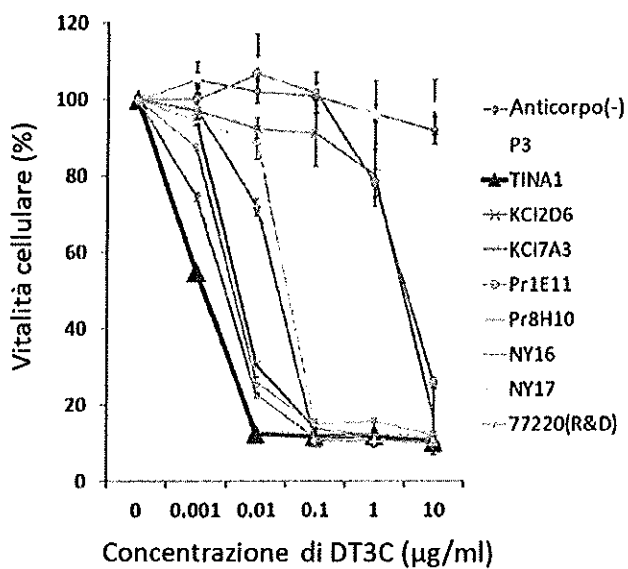


FIGURA 13

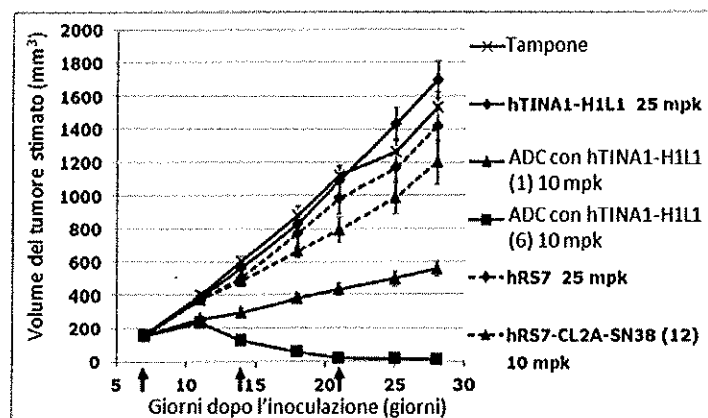


FIGURA 14

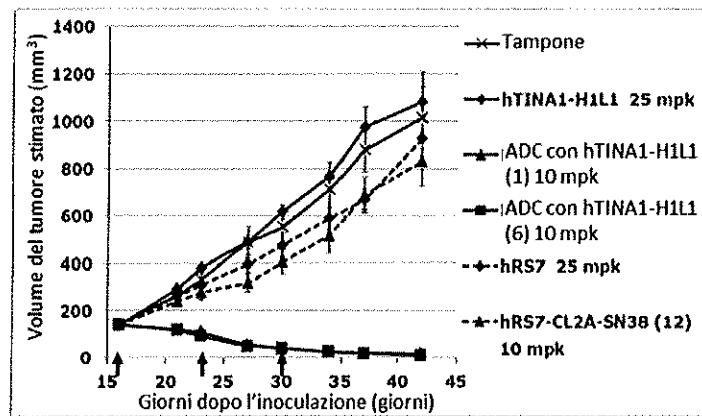


FIGURA 15

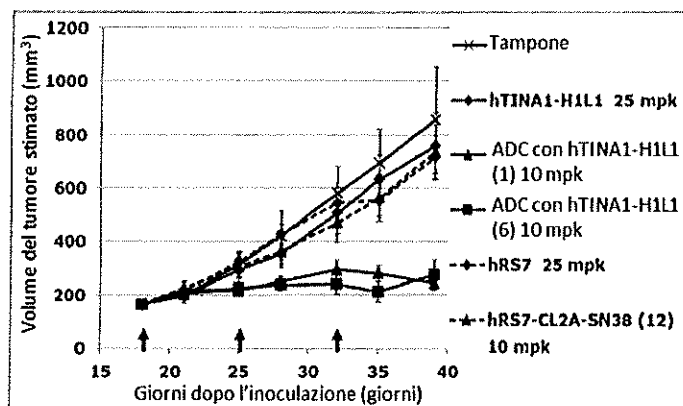


FIGURA 16

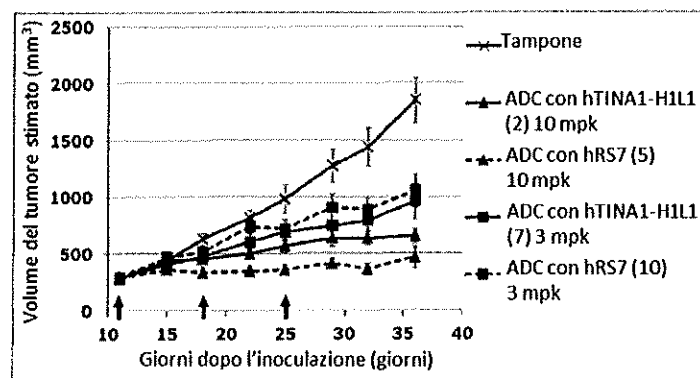


TAVOLA XVII

FIGURA 17

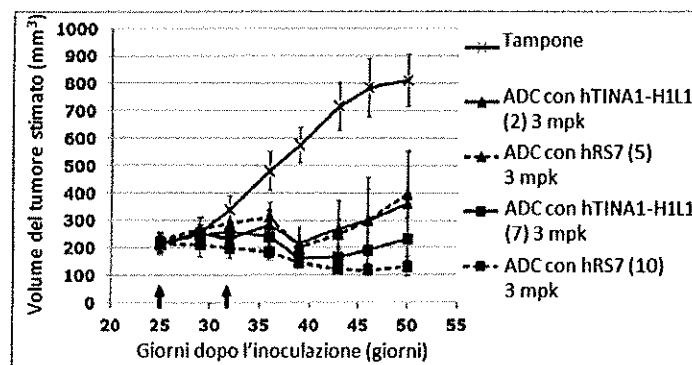


FIGURA 18

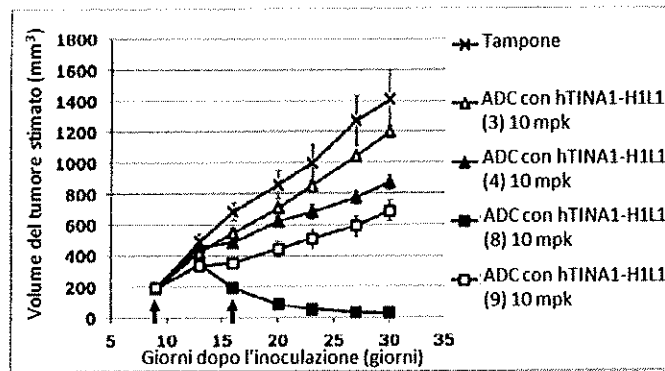


TAVOLA XIX

FIGURA 19

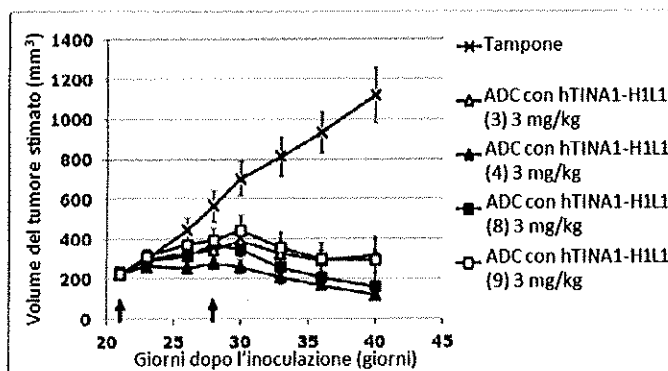


FIGURA 20

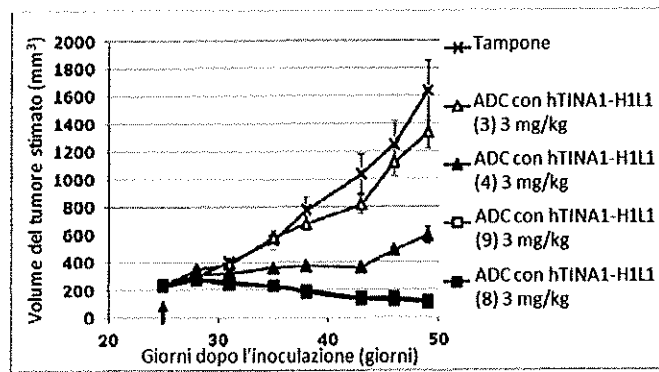


FIGURA 21

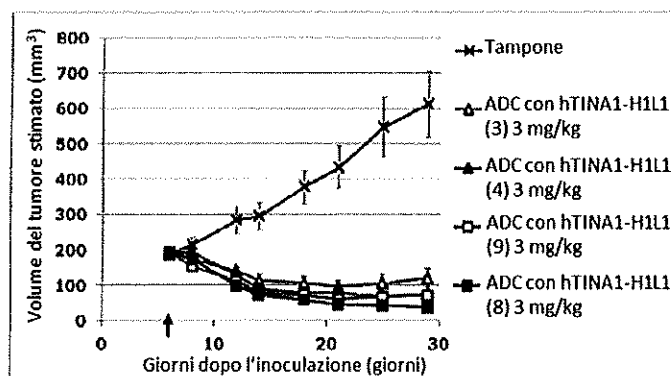


FIGURA 22

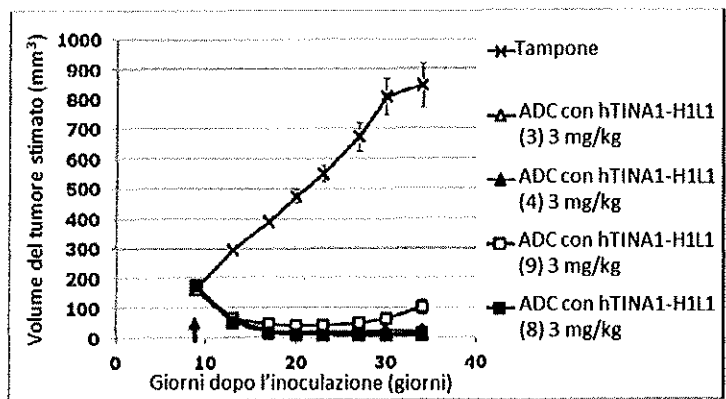


FIGURA 23

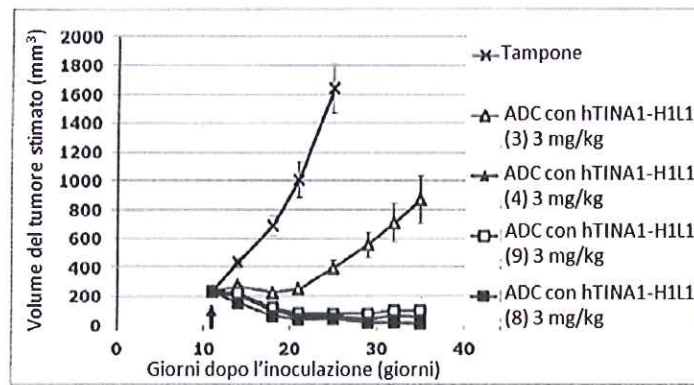


FIGURA 24

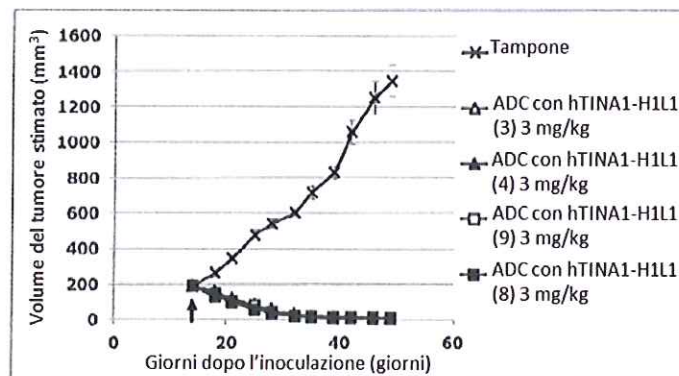


FIGURA 25

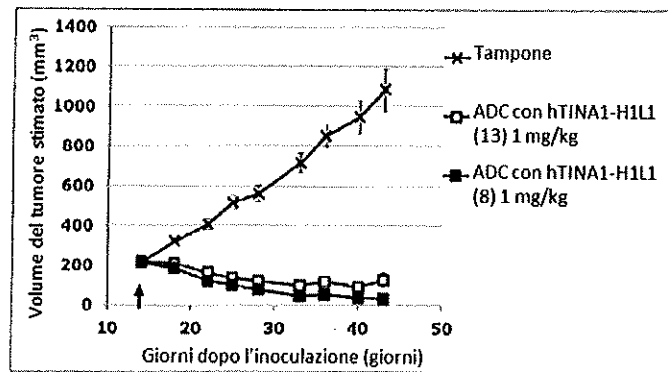


FIGURA 26

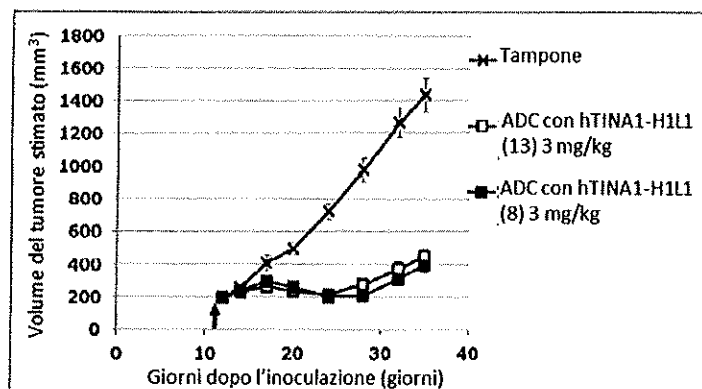


FIGURA 27

