

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047750**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.09.04**

**(51)** Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**202193256**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2020.05.28**

---

**(54) ДОЗИРОВАНИЕ КОНЬЮГАТА АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО**

---

**(31)** 62/853,970; 62/896,478

**(56)** CA-A1-3073924

**(32)** 2019.05.29; 2019.09.05

CA-A1-3074208

**(33)** US

EP-A1-3088419

**(43)** 2022.04.11

CA-A1-3046293

**(86)** PCT/IB2020/055078

CA-A1-3073383

**(87)** WO 2020/240467 2020.12.03

EP-A1-3315512

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ДАЙТИ САНКИО КОМПАНИ,  
ЛИМИТЕД (JP)**

Daiichi Sankyo: "First-in-human Study of DS-1062a for Advanced Solid Tumors", 17 January 2018 (2018-01-17), XP055719307, Retrieved from the Internet:URL:https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT03401385, [retrieved on 2020-07-30], Title; "Current Secondary Outcome Measures", pages 2-3; page 4 "Detailed Description"; pages 5-6 "Eligibility Criteria"

**(72)** Изобретатель:  
**Ногуты Ютака, Ямасита Томонари,  
Окадзима Дансукэ, Игути Такума,  
Ясуда Сатору (JP), Гринберг  
Джонатан (US)**

WO-A1-2020022475

WO-A1-2020027100

WO-A1-2020031936

WO-A1-2020016662

WO-A1-2020122034

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

---

**(57)** Изобретение относится к области фармацевтических препаратов, схем дозирования и введения конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Более конкретно, ADC состоит из антитела к антигену клеточной поверхности трофобластной клетки 2 (TROP2), соединенному через линкер с противораковым агентом, таким как ингибитор топоизомеразы I.

---

**047750**

**B1**

**047750**  
**B1**

### Область техники

Настоящее описание относится к области фармацевтических препаратов, схем дозирования и введения конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Более конкретно, ADC состоит из антитела к антигену клеточной поверхности трофобластной клетки 2 (TROP2), соединенного через линкер с ингибитором топоизомеразы I, таким как производное экзатекана.

### Родственные заявки

По этой заявке испрашивается приоритет согласно 35 USC § 119(e) предварительной заявки США № 62/853,970, поданной 29 мая 2019 г., и предварительной заявки США № 62/896,478, поданной 5 сентября 2019 г., все содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Уровень техники

Следующее обсуждение предоставлено только для того, чтобы помочь читателю понять описание, и не признается как описывающее или составляющее предшествующий уровень техники.

Антиген клеточной поверхности трофобластной клетки 2 (TROP2) представляет собой трансмембранный гликопротеин из 323 аминокислот, кодированный геном Tacstd2. Он является преобразователем внутриклеточного кальциевого сигнала (Ripani E, et al., *Int. J. Cancer*, 76(5), 671-676 (1998), и El Sewedy T, et al., *Int. J. Cancer*, 75(2), 324-330 (1998)), который дифференциально экспрессируется при многих видах рака. Он сигнализирует клеткам о самообновлении, пролиферации, инвазии и выживании. TROP2 дополнительно вовлечен в иммунную резистентность, которая является общей для трофобластных и раковых клеток человека (Faulk WP, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75(4), 1947-1951 (1978) и Lipinski M, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(8), 5147-5150 (1981)). Последовательность ДНК и аминокислотная последовательность TROP2 человека доступны в общедоступных базах данных, например, под номерами доступа NM\_002353 и NP\_002344 (NCBI).

Было обнаружено, что TROP2 сверхэкспрессируется в различных карциномах эпителиальных клеток по сравнению с низким уровнем экспрессии в нормальных эпителиальных клетках. Также сообщалось, что экспрессия TROP2 коррелирует с плохим прогнозом колоректального рака (Ohmachi T, et al., *Clin. Cancer Res.*, 12(10), 3057-3063 (2006)), рака желудка (Muhlmann G, et al., *J. Clin. Pathol.*, 62(2), 152-158 (2009)), рака поджелудочной железы (Fong D, et al., *Br. J. Cancer*, 99 (8), 1290-1295 (2008)), рак ротовой полости (Fong D, et al., *Br. J. Cancer*, 99(8), 1290-1295 (2008)) и глиомы (Ning S, et al., *Neural. Sci.*, 34(10), 1745-1750 (2013)), среди прочих. Используя клетки колоректального рака в качестве модели, дополнительно сообщалось, что экспрессия TROP2 вовлечена в независимый от каркаса рост опухолевых клеток и туморогенез у иммунодефицитных мышей (Wang J, et al., *Mol. Cancer Ther.*, 7(2), 280-285 (2008)).

Учитывая связь TROP2 с различными типами рака, было приготовлено и изучено множество анти-TROP2 антител. Среди этих антител были сообщения о неконъюгированном антителе, которое проявляет некоторую противоопухолевую активность в моделях ксенотрансплантатов у голых мышей (международные патентные публикации №№ WO2008/144891, WO2011/145744, WO2011/155579 и WO2013/077458), а также антителе, которое проявляет противоопухолевую активность в виде конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) (международные патентные публикации №№ WO2003/074566, WO2011/068845 и WO2013/068946 и патент США № 7999083). Однако сила и охват анти-TROP2 антител и ADC на сегодняшний день недостаточны, и все еще существует неудовлетворенная медицинская потребность в использовании TROP2 в качестве терапевтической мишени.

В настоящем описании представлен TROP2-специфический ADC и схемы его дозирования для лечения различных видов рака. Соответственно, настоящее изобретение удовлетворяет потребность в данной области техники в безопасных и эффективных методах лечения рака, таргетирующих TROP2.

### Сущность изобретения

Противоопухолевые антитела, таргетирующие TROP2, на сегодняшний день не достигли успеха, и многие противоопухолевые низкомолекулярные соединения имеют проблемы с безопасностью из-за неприемлемых побочных эффектов и токсичности (даже с соединениями, которые обладают превосходным противоопухолевым действием). Соответственно, остается потребность в достижении превосходного терапевтического эффекта при одновременном повышении безопасности. Таким образом, объектом настоящего описания является создание противоопухолевого лекарственного средства с превосходной терапевтической эффективностью и безопасностью.

Когда противоопухолевое соединение экзатекан превращают в конъюгат антитело-лекарственное средство через фрагмент линкерной структуры путем конъюгации с анти-TROP2 антителом, которое способно таргетировать опухолевые клетки, распознавать опухолевые клетки, связываться с опухолевыми клетками, интернализироваться внутри опухолевых клеток, или тому подобное, может быть приобретена цитотоксическая активность на основе антитела, и противоопухолевое соединение может более надежно доставляться к опухолевым клеткам, чтобы специфически проявлять противоопухолевый эффект. Таким образом, можно уверенно получить противоопухолевый эффект, и дозу противоопухолевого соединения можно уменьшить по сравнению с введением только соединения, что снижает отрицательное побочное действие на нормальные клетки и повышает безопасность.

В настоящем документе описаны новые ADC, таргетирующие TROP2, содержащие производное эк-

затекана и анти-TROP2 антитело, а также способы их использования.

В одном аспекте, настоящее описание представляет конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство для использования при лечении или профилактике рака, где конъюгат антитело-лекарственное средство включает анти-TROP2 антитело и противоопухолевое соединение, соединенное линкером.

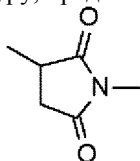
В другом аспекте, настоящее описание представляет способ лечения или профилактики рака у субъекта, включающий введение субъекту с раком конъюгата анти-TROP2-антитело-лекарственное средство, содержащего анти-TROP2-антитело и противоопухолевое соединение, соединенное линкером.

В другом аспекте, настоящее описание представляет применение конъюгата анти-TROP2 антитело-лекарственное средство в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики рака, где конъюгат антитело-лекарственное средство содержит анти-TROP2 антитело и противоопухолевое соединение, соединенное линкером.

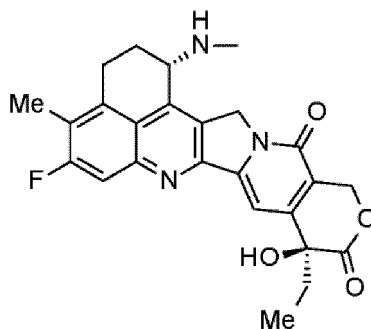
В некоторых вариантах осуществления, линкер и противоопухолевое соединение представлены следующей формулой:

$-(\text{сукцинимид-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$

где  $-(\text{сукцинимид-3-ил-N})-$  имеет структуру, представленную следующей формулой:



который связан с антителом в его положении 3 и связан с метиленовой группой в линкерной структуре, содержащей эту структуру на атоме азота в положении 1, и (NH-DX) является группой, представленной следующей формулой:



где атомом азота аминогруппы в положении 1 является соединительное положение.

В некоторых вариантах осуществления, анти-TROP2 антитело содержит CDRH1, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, CDRH2, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24, и CDRH3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25 в варибельной области тяжелой цепи и CDRL1, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26, CDRL2, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, и CDRL3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28 в варибельной области легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления, среднее количество единиц противоопухолевого соединения, конъюгированных на антитело, находится в диапазоне от 2 до 8 или от 3 до 8. В некоторых вариантах осуществления, среднее количество единиц противоопухолевого соединения, конъюгированных на антитело, находится в диапазоне от 3,4 до 4,5. В некоторых вариантах осуществления, среднее количество единиц противоопухолевого соединения, конъюгированных на антитело, составляет 4.

В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислоты 1-121 SEQ ID NO: 45, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислоты 1-109 SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, антитело включает тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, анти-TROP2 антитело не имеет лизиновый остаток на карбоксильном конце тяжелой цепи.

В некоторых вариантах осуществления, доза конъюгата антитело-лекарственное средство находится в диапазоне от 2 мг/кг до 10 мг/кг, которую вводят субъекту с раком. В некоторых вариантах осуществления, дозу конъюгата антитело-лекарственное средство примерно 4 мг/кг вводят субъекту, страдающему раком. В некоторых вариантах осуществления, дозу конъюгата антитело-лекарственное средство примерно 6 мг/кг вводят субъекту, страдающему раком. В некоторых вариантах осуществления, дозу конъюгата антитело-лекарственное средство примерно 8 мг/кг вводят субъекту, страдающему раком.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство вводят внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство вводят один раз каждые 3 недели или один раз каждые 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления, рак выбран из группы, состоящей из рака легких, рака почки, уротелиального рака, колоректального рака, рака простаты, мультиформной глиобластомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака груди, меланомы, рака печени, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака шейки матки, рака головы и шеи и рака пищевода. В некоторых вариантах осуществления, раком легкого является немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

В некоторых вариантах осуществления, рак является резистентным или рефрактерным. В некоторых вариантах осуществления, резистентностью или рефрактерностью является резистентность или рефрактерность, приобретенная раком из-за лечения противораковым лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления, противораковым лекарственным средством является ингибитор EGFR, ингибитор ALK, химиотерапевтический агент на основе платины или ингибитор контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления, противоопухолевым лекарственным средством является gefitinib, erlotinib, osimertinib, afatinib, alectinib, crizotinib, ceritinib, cisplatin, carboplatin, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, avelumab, ipilimumab, durvalumab, tislelizumab, sintilimumab или cemiplimumab.

В некоторых вариантах осуществления, раком является рак, экспрессирующий TROP2. В некоторых вариантах осуществления, раком, экспрессирующим TROP2, является рак, сверхэкспрессирующий TROP2. В некоторых вариантах осуществления, раком, сверхэкспрессирующим TROP2, является рак, получивший высокий балл за экспрессию TROP2 в иммуногистохимическом способе. В некоторых вариантах осуществления, раком, сверхэкспрессирующим TROP2, является рак, получивший высокий балл за экспрессию TROP2 в способе гибридизации *in situ*.

В некоторых вариантах осуществления, раком является неоперабельный или рецидивирующий рак.

В настоящем документе также представлены фармацевтические композиции, содержащие конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии с любым из вышеуказанных аспектов или вариантов осуществления или его соль в качестве активного компонента, и фармацевтически приемлемый компонент состава.

Вышеприведенное общее описание и последующее подробное описание являются иллюстративными и пояснительными и предназначены для предоставления дополнительного объяснения заявленного описания. Другие цели, преимущества и новые признаки будут очевидны специалистам в данной области техники из следующего краткого описания чертежей и подробного описания раскрытия.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 (фиг. 1) показана структура конъюгата антитело-лекарственное средство, таргетирующего TROP2 (в данном документе именуемого "конъюгат антитело-лекарственное средство (1)") с ингибитором топоизомеразы I (DXd). ADC содержит тетрапептидный линкер, связанный с цистеиновым остатком на антителе. Изображенный ADC имеет отношение лекарственного средства к антителу 4:1 (т.е. DAR4).

На фиг. 2 (фиг. 2) показаны последовательности тяжелой и легкой цепей анти-TROP2 антитела, которые могут быть включены в описанный ADC, и графическая формула цитотоксического агента, связанного с антителом.

На фиг. 3 (фиг. 3) показаны противоопухолевые эффекты конъюгатов антитело-лекарственное средство (1) и (2) на модели опухоли ксенотрансплантата CFPAC-1 у мыши.

На фиг. 4 (фиг. 4) показана оценка концентрации в плазме при повторном введении DS-1062a человеку.

На фиг. 5 (фиг. 5) показан дизайн фазы 1 исследования лечения пациентов с немелкоклеточным раком легкого (NSCLC).

На фиг. 6 (фиг. 6) показаны демографические данные и исходные характеристики пациентов для начального исследования фазы 1 (пример 5).

На фиг. 7 (фиг. 7) показано количество пациентов в начальной фазе 1 исследования (пример 5) с нежелательными явлениями, возникшими в ходе лечения (TEAE), которые произошли у  $\geq 10\%$  пациентов, независимо от причинной связи.

На фиг. 8 (фиг. 8) показан ответ опухоли субъектов (N=35) в первоначальной фазе 1 исследования (пример 5).

На фиг. 9 (фиг. 9) показан ответ опухолей в очагах-мишенях (A, B и C) и очагах вне мишени (D) после обработки DS-1062a в начальной фазе 1 исследования (пример 5). На панели A показано уменьшение размера очага-мишени у пациентов, получавших 4,0 мг/кг DS-1062a. На панели B показано уменьшение размера очага-мишени у другого пациента, получавшего 4,0 мг/кг DS-1062a. Панель C показывает уменьшение размера очагов-мишеней у пациентов, получавших 2,0 мг/кг DS-1062a. Панель D показывает уменьшение количества очагов вне мишеней у тех же пациентов, что и на панели C.

На фиг. 10 (фиг. 10) показано изменение размера опухоли у субъекта в начальной фазе 1 исследования (пример 5). Верхняя панель показывает наилучшее доленое изменение суммы самых длинных измерений по сравнению с исходным уровнем в очагах-мишенях субъектов из первоначального исследования фазы 1 (пример 5). На нижних панелях показан график изменения размера опухоли, разделенный на

группы дозирования.

На фиг. 11 (фиг. 11) показаны средние концентрации DS-1062a в плазме в цикле 1 (набор для анализа РК).

На фиг. 12 (фиг. 12) представлена сводная информация об эффективности, продемонстрированной в первоначальном исследовании фазы 1 (пример 5).

На фиг. 13 (фиг. 13) показано количество пациентов в исследовании фазы 1 на новую дату окончания (пример 6) с нежелательными явлениями, возникающими в ходе лечения (TEAE), независимо от причинной связи.

На фиг. 14 (фиг. 14) показано наилучшее доленое изменение суммы самых длинных измерений размеров от исходного уровня в очагах-мишенях субъектов из исследования фазы 1 на новую дату завершения сбора данных (пример 6).

На фиг. 15 (фиг. 15) показано четкое влияние дозы на частоту ответа, иллюстрируя доленое изменение размера опухоли для каждой группы дозирования в ходе исследования фазы 1 на новую дату завершения сбора данных (пример 6).

На фиг. 16 (фиг. 16) показаны стойкие противоопухолевые ответы, наблюдаемые при нескольких уровнях доз. Многие пациенты увидели частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD). Только два пациента имели прогрессирующее заболевание (PD) на момент завершения исследования (пример 6).

На фиг. 17 (фиг. 17) показан балл Н иммуногистохимии TROP2 (ИНС), основанный на биопсиях перед лечением пациентов в исследовании фазы 1 на новую дату завершения сбора данных (пример 6). Показатели ИНС, как правило, были выше у тех пациентов, которые достигли положительных результатов, таких как частичный ответ (PR). Для целей этих чертежей были использованы следующие сокращения: ингибитор киназы анапластической лимфомы (ALKi), исходный уровень (BL), цикл 3, день 1 (C3D1), свободно-циркулирующая ДНК (сцДНК), ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFRi), конец лечения (EOT), ингибитор рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2i), иммуногистохимия (ИНС), гисто-балл (Н-балл), иммуноонкология (I/O), не поддается оценке (NE), частичный ответ (PR), прогрессирующее заболевание (PD), стабильное заболевание (SD), пациент (Pt), частота вариантов аллелей (VAF).

На фиг. 18 (фиг. 18) показаны результаты доклинических исследований, показывающие, что конъюгат антитело-лекарственное средство (1) обладает противоопухолевой активностью на моделях мышей с ксенотрансплантатом рака легких с более сильной противоопухолевой активностью в TROP2-положительных опухолях (NCI-H2170 и HCC827) в отличие от TROP2-отрицательных опухолей (Calu-6).

На фиг. 19 (фиг. 19) показаны изменения частоты вариантов аллелей на основе внеклеточной ДНК (вкДНК) в ходе лечения. Результаты показывают, что вкДНК в целом уменьшилась в результате лечения.

На фиг. 20 (фиг. 20) показана суммарная эффективность терапии (ORR), оцененная по изменению объема опухоли у субъектов в различных группах дозирования исследования фазы 1 на новую дату завершения сбора данных (пример 6).

На фиг. 21 (фиг. 21) показана сводная информация об эффективности, продемонстрированной исследованием фазы 1, на новую дату завершения сбора данных (пример 6).

На фиг. 22 (фиг. 22) показан график изменения размера опухоли в зависимости от группы дозирования из предварительного исследования эффективности (пример 7).

На фиг. 23 (фиг. 23) показана концентрация в плазме конъюгата антитело-лекарственное средство (1), всего антитела и свободного лекарственного средства (полезной нагрузки) по данным фармакокинетических измерений из предварительного исследования эффективности (пример 7).

#### **Подробное описание**

Ниже со ссылкой на чертежи будут описаны различные варианты осуществления нового АСД, таргетизирующего TROP2, и способы его использования. Описанные ниже варианты осуществления даны как типовые примеры вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Конъюгатом анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению является противоопухолевое лекарственное средство, в котором анти-TROP2 антитело конъюгировано с противоопухолевым соединением через группу линкерной структуры и подробно поясняется ниже.

Определения.

Следует понимать, что способы не ограничиваются конкретными описанными вариантами осуществления и как таковые могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения. Объем настоящей технологии будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит это изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь, также могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, теперь описаны типовые иллюстративные способы и материалы.

Если предоставляется диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение,

вплоть до десятой единицы нижнего предела, если контекст явно не диктует иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим установленным или промежуточным значением в указанном диапазоне, входит в объем изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны, а также охватываются настоящим изобретением с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в изобретение.

Используемые в описании и формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки в единственном и множественном числе, если контекст явно не диктует иное.

Используемый в настоящем документе термин "содержащий" предназначен для обозначения того, что композиции и способы включают перечисленные элементы, но не исключают другие. "Состоящий по существу из", когда он используется для определения композиций и способов, означает исключение других элементов, имеющих какое-либо существенное значение для композиции или способа. "Состоит из" означает исключение более чем следовых элементов других ингредиентов для заявленных композиций и существенных этапов способа. Варианты осуществления, определенные каждым из этих переходных терминов, входят в объем настоящего описания. Соответственно, предполагается, что способы и композиции могут включать дополнительные стадии и компоненты (включающие) или, альтернативно, включая этапы и композиции, не имеющие значения (состоящие в основном из) или, альтернативно, предполагающие только указанные стадии или композиции (состоящие из) установленного способа.

Используемый в настоящем документе термин "примерно" означает плюс или минус 10%, а также указанное число. Например, "примерно 10" следует понимать как "10", так и "9-11".

Используемые в настоящем документе термины "необязательный" или "необязательно" означают, что описанное далее событие или обстоятельство может произойти или не произойти, и что описание включает случаи, когда указанное событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда оно не происходит.

Термины "индивидуум", "субъект" и "пациент" используют в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любому отдельному млекопитающему, например, корове, собаке, кошке, лошади, обезьяне, свинье, верблюду, летучей мыши или человеку, которых лечат в соответствии с описанными способами или применениями. В предпочтительных вариантах осуществления, субъектом является человек.

Используемые в настоящем документе фразы "эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" и "терапевтический уровень" означают дозу или концентрацию у субъекта, которая представляет конкретный фармакологический эффект, для которого ADC вводят субъекту, нуждающемуся в таком лечении, т.е. для лечения или профилактики рака (например, рака легких, рака, экспрессирующего TROP2, или резистентного или рефрактерного рака). Подчеркивается, что терапевтически эффективное количество или терапевтический уровень ADC не всегда будет эффективным при лечении рака, описанного в настоящем документе, даже если такая доза считается терапевтически эффективным количеством специалистами в данной области. Только для удобства, ниже представлены типовые дозировки, количества для доставки лекарственного средства, терапевтически эффективные количества и терапевтические уровни. Специалисты в данной области техники могут скорректировать такое количество в соответствии со стандартной практикой, если это необходимо для лечения конкретного субъекта и/или состояния. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от пути введения и дозированной формы, возраста и массы тела субъекта и/или состояния субъекта, включая тип и тяжесть рака.

Термины "лечение" или "лечить", используемые в настоящем документе в отношении рака, относятся к уменьшению, подавлению или устранению рака; уменьшению, подавлению или устранению роста раковых клеток; уменьшению, подавлению или устранению распространения рака; или вызову регресса или смерти опухоли или метастазов. Лечение и лечить могут также, необязательно, означать улучшение качества жизни или общей выживаемости субъекта, даже если рост раковых клеток не ингибируется и/или рак не умирает.

Термины "предотвращать" или "предотвращение", используемые в настоящем документе в отношении рака, относятся к устранению или предотвращению возникновения метастазов (т.е. роста рака во вторичных участках, где рак отсутствует в начале лечения), а также к устранению или предотвращению рецидива рака, если субъект достигает ремиссии или рак/опухоль полностью разрушается или погибает.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтическая композиция" относится к комбинации активного агента с носителем, инертным или активным, что делает композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического использования *in vivo* или *ex vivo*.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, таким как забуференный фосфатом физиологический раствор, вода, эмульсии (например, такие как эмульсии масло/вода или вода/масло) и различные типы смачивающих агентов. Композиции также могут включать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и адъювантов см., например, в Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences,

15<sup>th</sup> Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

Фразы "парентеральное введение" и "вводимый парентерально" в контексте настоящего описания означают способы введения, отличные от энтерального и местного, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интратекальное, внутрикапсульное, внутриглазное, внутрисердечное, внутрикожное, внутрибрюшинное, транстрахеальное, подкожное, подкожное, внутрисуставное, субкапсулярное, субарахноидальное, внутриспинальное и внутригрудное введение и инфузию.

Фразы "системное введение", "вводимое системно", "периферическое введение" и "вводимое периферически" в контексте настоящего описания означают любое введение соединения, лекарственного средства или другого материала, кроме непосредственно в центральную нервную систему, так что они попадают в систему пациента и, таким образом, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам, например, подкожное введение.

Используемый в настоящем документе термин "ген" включает не только ДНК, но также ее иРНК, ее кДНК и ее кРНК.

Используемый в настоящем документе термин "полинуклеотид" используется в том же значении, что и нуклеиновая кислота, и также включает ДНК, РНК, зонды, олигонуклеотиды и праймеры.

Используемые в настоящем документе термины "полипептид" и "белок" используют без различия.

Используемый в настоящем документе термин "клетка" также включает клетки животного и культивируемые клетки.

Используемый в настоящем документе термин "TROP2" используется в том же значении, что и белок TROP2.

Используемый в настоящем документе термин "CDR" относится к определяющей комплементарности области (CDR). Известно, что каждая тяжелая и легкая цепь молекулы антитела имеет три определяющие комплементарности области (CDR). CDR также называется гиперварибельным доменом и присутствует в варибельной области каждой тяжелой и легкой цепи антитела. Это сайт, который имеет необычно высокую варибельность в своей первичной структуре, и есть три отдельных CDR в первичной структуре каждой тяжелой и легкой полипептидной цепи. В этом описании, в том, что касается CDR антитела, CDR тяжелой цепи представлены CDRH1, CDRH2 и CDRH3 с amino-концевой стороны аминокислотной последовательности тяжелой цепи и CDR легкой цепи представлены CDRL1, CDRL2 и CDRL3 с amino-концевой стороны аминокислотной последовательности легкой цепи. Эти сайты расположены рядом друг с другом в третичной структуре и определяют специфичность антигена, с которым связывается антитело.

Фраза "гибридизация выполняется в жестких условиях", используемый в настоящем описании, относится к процессу, в котором гибридизацию проводят в условиях, при которых идентификация может быть достигнута путем выполнения гибридизации при 68°C в коммерчески доступном растворе для гибридизации ExpressHyb Hybridization Solution (производства Clontech, Inc.), или путем проведения гибридизации при 68°C в присутствии от 0,7 до 1,0 M NaCl с использованием фильтра, имеющего ДНК, иммобилизованную на них, с последующим выполнением промывки при 68°C с использованием от 0,1 до 2×SSC раствора (раствора 1×SSC состоящего из 150 mM NaCl и 15 mM цитрата натрия) или в эквивалентных этим условиям.

Используемый в настоящем документе термин "несколько" относится к 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 или 1-2.

В качестве аминокислотной замены в этом описании предпочтительна консервативная аминокислотная замена. Консервативная аминокислотная замена относится к замене, происходящей в группе аминокислот, относящейся к боковым цепям аминокислот. Предпочтительными аминокислотными группами являются следующие: кислотная группа (аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота); основная группа (лизин, аргинин и гистидин); не полярная группа (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин и триптофан); и незаряженное полярное семейство (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин и тирозин). Более предпочтительными аминокислотными группами являются следующие: алифатическая гидроксильная группа (серин и треонин); амидсодержащая группа (аспарагин и глутамин); алифатическая группа (аланин, валин, лейцин и изолейцин); и ароматическая группа (фенилаланин, триптофан и тирозин). Такую аминокислотную замену предпочтительно проводят в диапазоне, который не ухудшает свойств вещества, имеющего исходную аминокислотную последовательность.

На протяжении всего описания, где композиции описаны как имеющие, включающие или содержащие определенные компоненты, или где процессы и способы описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные стадии, рассматривается, что, дополнительно, существуют композиции настоящего описания, которые состоят по существу состоят из или состоят из перечисленных компонентов, и что существуют процессы и способы в соответствии с настоящим описанием, которые по существу состоят из, или состоят из перечисленных стадий обработки.

Как правило, доли, указанные в композициях, являются массовыми, если не указано иное. Кроме того, если переменная не сопровождается определением, то используется предыдущее определение переменной.

## TROP2.

TROP2 является членом семейства TACSTD, экспрессируемым в трофобластах человека, и является однопроходный трансмембранный белком клеточной мембраны типа 1, вовлеченным в иммунную резистентность, которая является общей для трофобластов человека и раковых клеток.

Для целей настоящего описания, белок TROP2 может быть непосредственно очищен из экспрессирующих TROP2 клеток человека или млекопитающего, не относящегося к человеку (такого как крыса или мышь), и использован, или фракция клеточной мембраны вышеописанных клеток может быть приготовлена и использована. Кроме того, TROP2 может быть получен *in vitro* синтезом или продуцированием в клетке-хозяине с помощью генной инженерии. В генной инженерии, в частности, после интеграции кДНК TROP2 в вектор, способный экспрессировать кДНК TROP2, белок TROP2 может быть получен путем синтеза в растворе, содержащем фермент, субстрат и энергетическое вещество, необходимое для транскрипции и трансляции, или путем экспрессии TROP2 в другой трансформированной прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Альтернативно, в качестве белка TROP2 можно использовать описанные выше генетически сконструированные клетки, экспрессирующие TROP2, или клеточную линию, экспрессирующую TROP2.

Последовательность ДНК и аминокислотная последовательность TROP2 доступны в общедоступной базе данных и могут быть указаны, например, под номерами доступа NM\_002353 и NP\_002344 (NCBI).

Кроме того, белок, который состоит из аминокислотной последовательности, в которой одна или несколько аминокислот заменены, удалены и/или добавлены в любую из вышеописанных аминокислотных последовательностей TROP2, а также имеет биологическую активность, эквивалентную активности этого белка, также включен в TROP2.

Белок TROP2 человека содержит сигнальную последовательность, состоящую из N-концевых 26 аминокислотных остатков, внеклеточный домен, состоящий из 248 аминокислотных остатков, трансмембранный домен, состоящий из 23 аминокислотных остатков, и внутриклеточный домен, состоящий из 26 аминокислотных остатков.

## Анти-TROP2 антитело.

Анти-TROP2 антитело, используемое в конъюгате анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему описанию, может быть получено от любого вида, и предпочтительные примеры видов могут включать людей, крыс, мышей и кроликов. В случае, если оно получено не из человека, его предпочтительно химеризовать или гуманизировать с использованием хорошо известной методики. Антителом по настоящему изобретению может быть поликлональное антитело или моноклональное антитело и, предпочтительно, является моноклональное антитело.

Анти-TROP2 антитело способно таргетировать опухолевые клетки, способно распознавать опухолевую клетку, способно связываться с опухолевой клеткой, способно интернализироваться в опухолевой клетке или подобное, и может быть превращено в конъюгат антитело-лекарственное средство путем конъюгации через линкер с соединением, обладающим противоопухолевой активностью.

Связывающая активность антитела против опухолевых клеток может быть подтверждена с помощью проточной цитометрии. Примеры способа подтверждения интернализации антитела в опухолевые клетки могут включать (1) анализ визуализации антитела, включенного в клетки, под флуоресцентным микроскопом с использованием связывания вторичного антитела (флуоресцентно меченного) с терапевтическим антителом (*Cell Death and Differentiation* (2008) 15, 751-761), (2) анализ измерения интенсивности флуоресценции, включенной в клетки, с использованием связывания вторичного антитела (флуоресцентно меченного) с терапевтическим антителом (*Molecular Biology of the Cell*, Vol. 15, 5268-5282, December 2004) или (3) анализ Mab-ZAP с использованием связывания иммунотоксина с терапевтическим антителом, где токсин высвобождается при включении в клетки для ингибирования роста клеток (*Bio Techniques* 28: 162-165, January 2000). Рекombинантный комплексный белок каталитической области дифтерийного токсина и белка G может быть использован в качестве иммунотоксина.

Поскольку лекарственное средство, конъюгированное в конъюгате антитело-лекарственное средство, оказывает противоопухолевый эффект, предпочтительно, но не обязательно, чтобы само антитело обладало противоопухолевым действием. С целью специфического и селективного проявления цитотоксической активности противоопухолевого соединения на опухолевые клетки важно, и также предпочтительно, чтобы антитело имело свойство интернализации для миграции в опухолевые клетки.

Анти-TROP2 антитело может быть получено с использованием способа, обычно применяемого в данной области техники, который включает иммунизацию животных антигенным полипептидом и сбор и очистку антител, продуцируемых *in vivo*. Происхождение антигена не ограничивается людьми, и животные могут быть иммунизированы антигеном, полученным от животного, не являющегося человеком, такого как мышь, крыса и подобные. В этом случае, перекрестная реактивность связывания антител с полученным гетерологичным антигеном с антигенами человека может быть протестирована для скрининга антитела, применимого к заболеванию человека.

Альтернативно, клетки, продуцирующие антитела, которые продуцируют антитела против антигена, сливают с клетками миеломы в соответствии со способом, известным в данной области техники (на-



пример, Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497; и Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)) для создания гибридом, из которых, в свою очередь, могут быть получены моноклональные антитела.

Антиген может быть получен путем генетического конструирования клеток-хозяев для получения гена, кодирующего антигенный белок. В частности, получают векторы, которые позволяют экспрессию гена антигена и переносят их в клетки-хозяева так, чтобы ген экспрессировался. Экспрессированный таким образом антиген может быть очищен. Антитело также можно получить с использованием способа иммунизации животных описанными выше генетически сконструированными антигенэкспрессирующими клетками или клеточной линией, экспрессирующей антиген.

Анти-TROP2 антитело может быть получено с помощью процедуры, известной в данной области техники.

Анти-TROP2 антитело, которое может быть использовано в настоящем изобретении, особо не ограничено, и, например, предпочтительно могут использоваться антитела, указанные в аминокислотных последовательностях, показанных в списке последовательностей настоящей заявки. Анти-TROP2 антитело, используемое в настоящем изобретении, предпочтительно имеет свойства, описанные ниже.

(1) Антитело, имеющее следующие свойства:

(a) специфическое связывание с TROP2, и

(b) наличие активности интернализации в клетках, экспрессирующих TROP2, через связывание с TROP2.

(2) Антитело по п. (1), где TROP2 является TROP2 человека.

(3) Антитело в соответствии с (1) или (2), где антитело имеет определяющую комплементарность область (CDR) H1, CDRH2 и CDRH3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 45 и/или CDRL1, CDRL2 и CDRL3 легкой цепи SEQ ID NO: 46. Альтернативно или дополнительно, антитело по (1) или (2), где антитело имеет CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 23, CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 24, и CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 25 в качестве определяющих комплементарность областей тяжелой цепи, и CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 26, CDRL2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 27, и CDRL3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 28, в качестве определяющих комплементарность областей легкой цепи.

(4) Антитело по любому из (1)-(3), где его константная область является константной областью, полученной от человека.

(5) Антитело по любому из (1)-(4), где антителом является гуманизованное антитело.

(6) Антитело по (5), где антитело имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (a) аминокислотной последовательности, описанной в аминокислотных положениях с 1 по 121 в SEQ ID NO: 45, (b) аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 95% или более высокую гомологию с (a), и (c) аминокислотной последовательности, полученной из любой из последовательностей (a) или (b) путем делеций, замен, или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты и переменной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (d) аминокислотной последовательности, описанной в аминокислотных положениях с 1 по 109 в SEQ ID NO: 46, (e) аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 95% или более высокую гомологию с (d), и (f) аминокислотной последовательности, полученной из любой из последовательностей (d) или (e) путем делеций, замен или добавлений, по меньшей мере, одной аминокислоты. Альтернативно или дополнительно, антитело по (5), где антитело имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (a) аминокислотной последовательности, описанной в аминокислотных положениях 20-140 в SEQ ID NO: 12, (b) аминокислотной последовательности, описанной в аминокислотных положениях 20-140 в SEQ ID NO: 14, (c) аминокислотной последовательности, описанной в аминокислотных положениях 20-140 в SEQ ID NO: 16, (d) аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 95% или более высокую гомологию с любой из последовательностей (a)-(c), и (e) аминокислотной последовательности, полученной из любой из последовательностей (a)-(c) путем делеций, замены или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты и переменной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (f) аминокислотной последовательности, описанной в аминокислотных положениях с 21 по 129 в SEQ ID NO: 18, (g) аминокислотной последовательности, описанной в аминокислотных положениях 21-129 в SEQ ID NO: 20, (h) аминокислотной последовательности, описанной в аминокислотных положениях 21-129 в SEQ ID NO: 22, (i) аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 95% или более высокую гомологию с любой из последовательностей (f)-(h), и (j) аминокислотной последовательности, полученной из любой из последовательностей (f)-(h) путем делеций, замен или добавлений, по меньшей мере, одной аминокислоты.

(7) Антитело по (6), где антитело имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 1-121 в SEQ ID NO: 45, и



следовательность, описанную в аминокислотных положениях 21-234 в SEQ ID NO: 20, тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 20-470 в SEQ ID NO: 14, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 21-234 в SEQ ID NO: 22, тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 20-470 в SEQ ID NO: 16, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 21-234 в SEQ ID NO: 18, тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 20-470 в SEQ ID NO: 16, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 21-234 в SEQ ID NO: 20, и тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 20-470 в SEQ ID NO: 16, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 21-234 в SEQ ID NO: 22.

(10) Антитело по (6) или (7), где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 46. Альтернативно или дополнительно, антитело по (6) или (7), где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, выбранную из группы, состоящей из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 12 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 18, тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 12, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20, тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 12, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 22, тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 14, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 18, тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 14, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20, тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 14, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 22, тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 16, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 18, тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 16, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 16 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 22.

(11) Антитело по (8), где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, выбранную из группы, состоящей из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 20-470 в SEQ ID NO: 12, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 21-234 в SEQ ID NO: 18, тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 20-470 в SEQ ID NO: 14, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 21-234 в SEQ ID NO: 18, тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 20-470 в SEQ ID NO: 14, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 21-234 в SEQ ID NO: 20, и тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 20-470 в SEQ ID NO: 16, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в аминокислотных положениях 21-234 в SEQ ID NO: 22.

(12) Антитело по любому из (1)-(11), где антитело не имеет лизиновый остаток на карбоксильном конце тяжелой цепи.

(13) Антитело, полученное способом получения антитела в соответствии с любым из (1)-(12), где способ включает стадии: культивирования клетки-хозяина, трансформированной вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, кодирующий антитело; и сбор представляющего интерес антитела из культур, полученных на предыдущей стадии.

Для целей настоящего описания полные последовательности SEQ ID NO: 45 и 46 показаны в табл. 1 ниже (а также на фиг. 2).

Таблица 1

Аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей типового анти-TROP2 антитела

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQGLE WMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVY

	YCARGFGSSYWFYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVTAVAWYQQKPKAPKLLI YSASYRYTGVPFSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTF GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Продуцирование анти-TROP2 антитела.

Анти-TROP2 антитело по изобретению может быть получено с использованием способа, обычно применяемого в данной области техники, который включает иммунизацию животного TROP2 или произвольным полипептидом, выбранным из аминокислотной последовательности TROP2, и сбор и очистку антитела, продуцируемого *in vivo*. Биологический вид TROP2, используемого в качестве антигена, не ограничивается человеком, и животное может быть иммунизировано TROP2, полученным от животного, отличного от человека, такого как мышь или крыса. В этом случае, исследуя перекрестную реактивность между связыванием антитела с полученным гетерологичным TROP2 и TROP2 человека, можно выбрать антитело, применимое к заболеванию человека.

Кроме того, моноклональное антитело может быть получено из гибридомы, полученной путем слияния одной или нескольких продуцирующих антитело клеток, которые продуцируют анти-TROP2 антитело, с клетками миеломы в соответствии с известным способом (например, Kohler and Milstein, *Nature*, (1975) 256, pp. 495-497; Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, pp. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)).

TROP2 для использования в качестве антигена может быть получен путем экспрессии гена TROP2 в клетке-хозяине с использованием генной инженерии. В частности, можно получить вектор, способный экспрессировать ген TROP2, и полученный вектор можно трансфицировать в клетку-хозяин для экспрессии гена, и затем можно очистить экспрессированный TROP2.

Альтернативно, в качестве белка TROP2 можно использовать описанные выше генетически сконструированные клетки, экспрессирующие TROP2, или клеточную линию, экспрессирующую TROP2. Далее конкретно описывается способ получения анти-TROP2 антитела.

#### (1) Получение антигена

Примеры антигена, который будет использоваться для получения анти-TROP2 антитела, включают TROP2 или полипептид, состоящий из частичной аминокислотной последовательности, содержащей, по меньшей мере, 6 последовательных аминокислот TROP2, или производное, полученное путем добавления данной аминокислотной последовательности или носителя.

TROP2 может быть очищен непосредственно из опухолевых тканей или опухолевых клеток человека и использован. Кроме того, TROP2 может быть получен синтезом *in vitro* или продуцированием в клетке-хозяине с помощью генной инженерии.

Что касается генной инженерии, в частности, после интеграции кДНК TROP2 в вектор, способный экспрессировать кДНК TROP2, антиген может быть получен путем его синтеза в растворе, содержащем фермент, субстрат и энергетическое вещество, необходимое для транскрипции и трансляции, или путем экспрессии TROP2 в другой трансформированной прокариотической или эукариотической клетке-хозяине.

Кроме того, антиген также может быть получен в виде секреторного белка путем экспрессии слитого белка, полученного путем лигирования внеклеточного домена TROP2, которым является мембранный белок, с константной областью антитела в соответствующей системе хозяин-вектор.

кДНК TROP2 может быть получена, например, с помощью так называемого способа ПЦР, в котором полимеразную цепную реакцию (далее именуемая "ПЦР"; см. Saiki, R. K., et al., *Science*, (1988) 239, pp. 487-489) выполняют с использованием библиотеки к ДНК экспрессирующей к ДНК TROP2 в качестве матрицы, и праймеров, которые специфически амплифицируют кДНК TROP2.

В качестве примера синтеза полипептида *in vitro* можно привести, например, Rapid Translation System (RTS) от Roche Diagnostics, Inc., но не ограничиваясь ей.

Примеры прокариотических клеток-хозяев включают *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. Чтобы трансформировать клетки-хозяева геном-мишенью, клетки-хозяева трансформируют плазмидным вектором, содержащим репликон, т.е. точку начала репликации, происходящую от вида, совместимого с хо-

зияном, и регуляторную последовательность. Кроме того, вектор предпочтительно имеет последовательность, способную придавать фенотипическую селективность трансформированной клетке.

Примеры эукариотических клеток-хозяев включают клетки позвоночных, клетки насекомых и дрожжевые клетки. В качестве клеток позвоночных, например, часто используют клетки COS обезьян (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650; ATCC: American Type Culture Collection), фибробласты NIH3T3 мыши (ATCC No. CRL-1658) и штаммы с дефицитом дигидрофолатредуктазы (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) клеток яичника китайского хомячка (клетки CHO; ATCC: CCL-61); и подобные, однако клетки не ограничиваются этим.

Полученный таким образом трансформант можно культивировать в соответствии со способом, обычно применяемым в данной области техники, и путем культивирования трансформанта целевой полипептид продуцируется внутриклеточно или внеклеточно.

Подходящая среда, которая будет использоваться для культивирования, может быть выбрана специалистами в данной области техники из различных обычно используемых культуральных сред в зависимости от используемых клеток-хозяев. Если используют *Escherichia coli*, например, можно использовать среду LB с добавлением антибиотика, такого как ампициллин или IPMG, по мере необходимости.

Рекомбинантный белок, продуцируемый трансформантом внутриклеточно или внеклеточно посредством такого культивирования, может быть разделен и очищен любым из различных известных способов разделения с использованием физического или химического свойства белка.

Конкретные примеры способов включают обработку обычным белковым преципитирующим агентом, ультрафильтрацию, различные типы жидкостной хроматографии, такие как хроматография на молекулярных ситах (гель-фильтрация), адсорбционная хроматография, ионообменная хроматография и аффинная хроматография, диализ и их комбинация.

Кроме того, путем присоединения метки из шести гистидиновых остатков к рекомбинантному белку, который должен быть экспрессирован, белок можно эффективно очистить с помощью аффинной колонки с никелем. Альтернативно, присоединяя Fc-область IgG к рекомбинантному белку, который должен быть экспрессирован, белок можно эффективно очистить с помощью колонки с белком A.

Комбинируя описанные выше способы, можно легко получить большое количество полипептида-мишени с высоким выходом и высокой чистотой.

Сам описанный выше трансформант также можно использовать в качестве антигена. Альтернативно, в качестве антигена можно использовать клеточную линию, экспрессирующую TROP2. Примеры такой клеточной линии могут включать в себя линии рака легких человека NCI-H322, PC14, NCIH-H2122 и LCAM1, линию рака предстательной железы человека PC3, линии рака поджелудочной железы человека VxPC-3, Сарап-1 и PK-1, линию рака яичников человека SKOV3 и линию рака прямой кишки человека COLO205, хотя клеточная линия согласно настоящему изобретению не ограничивается этими линиями клеток при условии, что они экспрессируют TROP2.

#### (2) Продуцирование моноклонального анти-TROP2 антитела

Примеры антитела, специфически связывающегося с TROP2, включают моноклональное антитело, специфически связывающееся с TROP2, и способ получения такого антитела описан ниже.

Продуцирование моноклональных антител обычно требует следующих операционных стадий:

- (a) очистка биополимера для использования в качестве антигена или получение антиген-экспрессирующих клеток;
- (b) получение антитело-продуцирующих клеток путем иммунизации животного путем инъекции антигена, сбора крови, анализа его титра антител для определения момента иссечения селезенки;
- (c) получение клеток миеломы (в дальнейшем именуемых "миелома");
- (d) слияние клеток, продуцирующих антитела, с миеломой;
- (e) скрининг группы гибридом, продуцирующих желаемое антитело;
- (f) деление гибридом на одноклеточные клоны (клонирование);
- (g) необязательно, культивирование гибридомы или выращивание животного, которому имплантирована гибридома, для продуцирования большого количества моноклонального антитела;
- (h) исследование полученного таким образом моноклонального антитела на биологическую активность и специфичность связывания, или анализ его свойств в качестве меченого реагента; и подобные.

В дальнейшем способ продуцирования моноклонального антитела будет подробно описан после описанных выше стадий, однако способ не ограничивается этим, и, например, можно использовать продуцирующие антитело клетки, отличные от клеток селезенки и миеломы.

#### (a) Очистка антигена.

В качестве антигена можно использовать TROP2, полученный описанным выше способом, или его частичный пептид.

Кроме того, в качестве антигена также можно использовать мембранную фракцию, полученную из рекомбинантных клеток, экспрессирующих TROP2, или рекомбинантных клеток, экспрессирующих сам TROP2, а также частичный пептид белка по изобретению, химически синтезированный способом, известным специалистам в данной области техники.

Кроме того, в качестве антигена также можно использовать клеточную линию, экспрессирующую

## TROP2.

(b) Получение клеток, продуцирующих антитела.

Антиген, полученный на стадии (а), смешивают с адъювантом, таким как полный или неполный адъювант Фрейнда, или вспомогательным агентом, таким как сульфат алюминия-калия, и полученную смесь используют в качестве иммуногена для иммунизации экспериментального животного. В альтернативном способе, экспериментальное животное иммунизируют антигенэкспрессирующими клетками в качестве иммуногена. В качестве экспериментального животного можно беспрепятственно использовать любое животное, используемое в известном способе получения гибридомы. В частности, можно использовать, например, мышь, крысу, козу, овцу, крупный рогатый скот, лошадь или подобное животное. Однако с точки зрения доступности клеток миеломы для слияния с экстрагированными клетками, продуцирующими антитела, в качестве иммунизируемого животного предпочтительно использовать мышь или крысу.

Кроме того, штамм мыши или крысы, который будет использоваться, особо не ограничен, и в случае мышей, например, могут использоваться различные штаммы, такие как A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB и 129 и подобные, а в случае крысы, например, можно использовать Wistar, Low, Lewis, Sprague, Dawley, ACI, BN, Fischer и подобные.

Этих мышей и крыс можно получить от заводчиков/дистрибьюторов экспериментальных животных, например, CLEA Japan, Inc. и Charles River Laboratories Japan, Inc.

С учетом совместимости слияния с клетками миеломы, описанными ниже, особенно предпочтительны в случае мышей штамм BALB/c и в случае крыс штаммы Wistar и Low в качестве иммунизируемого животного.

Кроме того, принимая во внимание антигенную гомологию между людьми и мышами, также предпочтительно использовать мышь с пониженной биологической функцией для удаления аутоантител, т.е. мышь с аутоиммунным заболеванием.

Возраст такой мыши или крысы на момент иммунизации предпочтительно составляет от 5 до 12 недель, более предпочтительно, от 6 до 8 недель.

Чтобы иммунизировать животное TROP2 или его рекомбинант, например, можно использовать известный способ, подробно описанный, например, в Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) или подобный.

Среди этих способов иммунизации, предпочтительным конкретным способом в соответствии с настоящим изобретением является, например, следующий.

То есть, во-первых, фракцию мембранного белка, служащую антигеном или клетками, вызывающими экспрессию антигена, вводят животному внутрикожно или внутрибрюшинно. Однако комбинация обоих способов введения является предпочтительной для повышения эффективности иммунизации, и когда внутрикожное введение проводят в первой половине, а внутрибрюшинное введение проводят во второй половине или только при последней дозировке, эффективность иммунизации может быть особенно увеличена.

Схема введения антигена варьируется в зависимости от типа иммунизируемого животного, индивидуальных различий и подобных. Однако, в целом, схема введения, в которой частота введения антигена составляет от 3 до 6 раз, и интервал дозирования составляет от 2 до 6 недель является предпочтительной, и схема введения, в которой частота введения антигена составляет от 3 до 4 раз и интервал дозирования составляет от 2 до 4 недель, является более предпочтительной.

Кроме того, доза антигена варьируется в зависимости от типа животного, индивидуальных различий и подобных, однако доза обычно устанавливается от 0,05 до 5 мг, предпочтительно, от примерно 0,1 до 0,5 мг.

Бустерную иммунизацию проводят через 1-6 недель, предпочтительно, от 1 до 4 недель, более предпочтительно, от 1 до 3 недель после введения антигена, как описано выше. Когда иммуногеном является клетка, применяют от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  клеток.

Доза антигена во время проведения бустерной иммунизации варьируется в зависимости от типа или размера животного или подобного, однако в случае, например, мыши, доза обычно устанавливается от 0,05 до 5 мг, предпочтительно, от 0,1 до 0,5 мг, более предпочтительно, от примерно 0,1 до 0,2 мг. Когда иммуногеном является клетка, применяют от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  клеток.

Клетки селезенки или лимфоциты, включая клетки, продуцирующие антитела, асептически удаляют из иммунизированного животного через 1-10 дней, предпочтительно 2-5 дней, более предпочтительно 2-3 дня после бустерной иммунизации. В это время измеряют титр антител, и если животное, имеющее достаточно повышенный титр антител, используют в качестве источника питания клеток, продуцирующих антитела, последующая процедура может быть проведена более эффективно.

Примеры используемого в настоящем документе способа измерения титра антител включают способ RIA и способ ELISA, но способ не ограничивается этим. Например, если используют способ ELISA,

измерение титра антител в соответствии с изобретением может проводиться в соответствии с процедурами, описанными ниже.

Сначала, очищенный или частично очищенный антиген адсорбируют на поверхности твердой фазы, такой как 96-луночный планшет для ELISA, и поверхность твердой фазы, не имеющую адсорбированного антигена, покрывают белком, не связанным с антигеном, таким как бычий сывороточный альбумин (BSA). После промывки поверхности, поверхность приводят в контакт с серийно разведенным образцом (например, сывороткой мыши) в качестве первичного антитела, чтобы позволить антителу в образце связываться с антигеном.

Кроме того, в качестве вторичного антитела, добавляют антитело, меченное ферментом против антитела мыши, и ему дают возможность связываться с антителом мыши. После промывки добавляют субстрат для фермента и измеряют изменение оптической плотности, которое происходит из-за развития цвета, вызванного разложением субстрата или подобное, и на основании измерения рассчитывают титр антитела.

Отделение клеток, продуцирующих антитело, от клеток селезенки или лимфоцитов иммунизированного животного может проводиться в соответствии с известным способом (например, Kohler et al., *Nature* (1975), 256, p. 495; Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* (1977), 6, p. 511; Milstein et al., *Nature* (1977), 266, p. 550; Walsh, *Nature* (1977), 266, p. 495). Например, в случае клеток селезенки, может применяться общий способ, в котором клетки, продуцирующие антитела, разделяют гомогенизацией селезенки для получения клеток через фильтрацию с применением сита из нержавеющей стали, и суспендированием клеток в минимальной эссенциальной среде Игла (MEM).

(с) Подготовка клеток миеломы (далее именуемых "миелома").

Клетки миеломы, используемые для слияния клеток, особо не ограничены, и подходящие клетки могут быть выбраны из известных клеточных линий. Однако, из соображений удобства, если гибридому выбирают из слитых клеток, предпочтительно использовать штамм с дефицитом HGPRT (гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы), методика отбора которого разработана.

Более конкретно, примеры штамма с дефицитом HGPRT включают X63-Ag8(X63), NS1-ANSA (NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), FO, S149/5XXO и BU.1, полученные от мышей; 210.RSY3.Ag.1.2.3 (Y3), полученный от крысы; и U266AR(SKO-007), GM1500-GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) и 8226AR/NIP4-1(NP41), полученные от человека. Эти штаммы с дефицитом HGPRT доступны, например, в ATCC и подобных.

Эти клеточные штаммы субкультивируют в подходящей среде, такой как среда с 8-азагуанином (среда, полученная путем добавления 8-азагуанина к среде RPMI 1640 с добавлением глутамина, 2-меркаптоэтанол, гентамицина и фетальной телячьей сыворотки (далее именуемой "FBS"), среды Дульбекко, модифицированной по Искову (IMDM) или среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM). В этом случае, за 3-4 дня до проведения слияния клеток, клетки субкультивируют в нормальной среде (например, среде ASF104 (производства Ajinomoto Co., Ltd.), содержащего 10% FCS), чтобы гарантировать не менее  $2 \times 10^7$  клеток в день слияния клеток.

(d) Слияние клеток.

Слияние между клетками, продуцирующими антитела, и клетками миеломы может быть соответственно выполнено в соответствии с известным способом (Weir, D. M. *Handbook of Experimental Immunology* Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. and Mayer, M. M., *Experimental Immunochemistry*, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), и т. д.), в условиях, при которых выживаемость клеток не снижается чрезмерно.

В качестве такого способа, например, может применяться химический способ, в котором клетки, продуцирующие антитела, и клетки миеломы смешивают в растворе, содержащем полимер, такой как полиэтиленгликоль, в высокой концентрации, физический способ с использованием электрической стимуляции и подобные. Для этих способов конкретный пример химического способа описан ниже.

То есть, в случае, когда полиэтиленгликоль используют в растворе, содержащем полимер в высокой концентрации, клетки, продуцирующие антитела, и клетки миеломы смешивают в растворе полиэтиленгликоля с молекулярной массой от 1500 до 6000, более предпочтительно, 2000 до 4000, при температуре от 30 до 40°C, предпочтительно, от 35 до 38°C в течение от 1 до 10 мин, предпочтительно от 5 до 8 мин.

(e) Селекция группы гибридом.

Способ селекции гибридом, полученных описанным выше слиянием клеток, особо не ограничивается. Обычно используют способ селекции НАТ (гипоксантин, аминоптерин, тимидин) (Kohler et al., *Nature* (1975), 256, p. 495; Milstein et al., *Nature* (1977), 266, p. 550).

Этот способ эффективен, когда гибридомы получены с использованием клеток миеломы штамма с дефицитом HGPRT, которые не могут выжить в присутствии аминоптерина. То есть, путем культивирования не слитых клеток и гибридом в среде НАТ, только гибридомам, резистентным к аминоптерину, селективно позволяют выжить и пролиферировать.

(f) Деление на одноклеточные клоны (клонирование).

В качестве способа клонирования гибридом можно использовать известный способ, такой как способ метилцеллюлозы, способ мягкой агарозы или способ ограниченного разведения (см., например, Barbara, B. M. and Stanley, M. S.: *Selected Methods in Cellular Immunology*, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Среди этих способов, в частности, предпочтительным является способ трехмерного культивирования, такой как способ метилцеллюлозы. Например, группу гибридом, полученных путем слияния клеток, суспендируют в среде с метилцеллюлозой, такой как ClonaCell-HY Selection Medium D (производство StemCell Technologies, Inc., # 03804), и культивируют. Затем собирают образовавшиеся колонии гибридом, в результате чего могут быть получены моноклональные гибридомы. Собранные соответствующие колонии гибридомы культивируют, и гибридоме, у которой подтвержден стабильный титр антител в полученном супернатанте культуры гибридомы, выбирают в качестве штамма гибридомы, продуцирующего моноклональные антитела TROP2.

Примеры установленного таким образом штамма гибридомы включают гибридоме TROP2 TINA1. В этом описании антитело, продуцированное гибридомой TROP2 TINA1, названо "антитело TINA1" или просто "TINA1".

Вариабельная область тяжелой цепи антитела TINA1 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 в списке последовательностей. Кроме того, вариабельная область легкой цепи антитела TINA1 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4 в списке последовательностей.

(g) Получение моноклонального антитела путем культивирования гибридомы. Посредством культивирования выбранной таким образом гибридомы можно эффективно получить моноклональное антитело. Однако перед культивированием предпочтительно провести скрининг гибридомы, которая продуцирует моноклональное антитело-мишень.

При таком скрининге можно использовать известный способ.

Измерение титра антител в соответствии с изобретением можно проводить, например, с помощью способа ELISA, описанного в пункте (b), описанном выше.

Гибридома, полученная способом, описанным выше, может быть сохранена в замороженном состоянии в жидком азоте или в морозильной камере при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  или ниже.

После завершения клонирования среду меняют с HT среды на нормальную среду, и гибридоме культивируют.

Крупномасштабное культивирование проводят путем ротационного культивирования с использованием большой культуральной колбы или способом вращающихся пробирок. Из супернатанта, полученного в результате крупномасштабного культивирования, может быть получено моноклональное антитело, которое специфически связывается с белком по изобретению, путем очистки с использованием способа, известного специалистам в данной области техники, такого как гель-фильтрация.

Далее гибридоме вводят в брюшную полость мыши того же штамма, что и гибридома (например, описанной выше BALB/c) или мыши Nu/Nu для пролиферации гибридомы, в результате чего может быть получен асцит, содержащий большое количество моноклонального антитела по изобретению.

В случае, когда гибридоме вводят в брюшную полость, если за 3-7 дней до этого вводить минеральное масло, такое как 2,6,10,14-тетраметилпентадекан (пристан), может быть получено большее количество асцита.

Например, иммунодепрессант предварительно вводят в брюшную полость мыши того же штамма, что и гибридома, для инактивации T-клеток. Через 20 дней от  $10^6$  до  $10^7$  клонированных клеток гибридомы суспендируют в бессывороточной среде (0,5 мл), и суспензию вводят в брюшную полость мыши. В общем, когда живот расширен и заполнен асцитом, у мыши собирают асцит. С помощью этого способа, моноклональное антитело может быть получено в концентрации, которая примерно в 100 раз или намного выше, чем в культуральном растворе.

Моноклональное антитело, полученное описанным выше способом, может быть очищено способом, описанным в, например, Weir, D. M.: *Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III*, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

Полученное таким образом моноклональное антитело имеет высокую антигенную специфичность к TROP2.

(h) Анализ моноклонального антитела.

Изотип и подкласс полученного таким образом моноклонального антитела можно определить следующим образом.

Во-первых, примеры способа идентификации включают способ Ouchterlony, способ ELISA и способ RIA.

Способ Ouchterlony прост, но при низкой концентрации моноклональных антител требуется операция конденсации.

С другой стороны, когда используют способ ELISA или способ RIA, путем прямой реакции супернатанта культуры с твердой фазой, адсорбированной антигеном, и использования антител, соответствующих различным типам изотипов и подклассов иммуноглобулинов, в качестве вторичных антител



можно идентифицировать изотип и подкласс моноклонального антитела.

Кроме того, в качестве более простого способа также можно использовать коммерчески доступный набор для идентификации (например, Mouse Typing Kit производства Bio-Rad Laboratories, Inc.) или аналогичный.

Кроме того, количественное определение белка может быть выполнено с помощью способа Folin Lowry и способа расчета, основанного на оптической плотности при 280 нм ( $OD_{280}$ )=иммуноглобулин 1 мг/мл).

Кроме того, даже когда моноклональное антитело получают отдельно и независимо путем повторного выполнения стадий (a)-(h) в (2), можно получить антитело, обладающее цитотоксической активностью, эквивалентной таковой антитела TINA1 или антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 46. Одним примером такого антитела является антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело TINA1, или антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 45 и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 46. Если вновь полученное моноклональное антитело связывается с частичным пептидом или частичной третичной структурой, к которой относится антитело TINA1 или антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 45 и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 46, можно определить, что моноклональное антитело связывается с одним тем же эпитопом. Кроме того, подтверждая, что моноклональное антитело конкурирует с антителом TINA1 или антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 46, за связывание с TROP2 (т.е. моноклональное антитело ингибирует связывание между антителом TINA1 или антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 46 и TROP2), можно определить, что моноклональное антитело связывается с тем же эпитопом, что и анти-TROP2 антитело, даже если конкретная последовательность или структура эпитопа не были определены. Когда подтверждается, что моноклональное антитело связывается с тем же эпитопом, что и анти-TROP2 антитело, ожидается, что моноклональное антитело будет иметь антигенсвязывающую аффинность и биологическую активность, эквивалентную таковой у антитела TINA1 или антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 46.

### (3) Другие антитела.

Антитело по изобретению включает не только вышеописанное моноклональное анти-TROP2 антитело, но также рекомбинантное антитело, полученное путем искусственной модификации с целью снижения гетерологичной антигенности для человека, такое как химерное антитело, гуманизованное антитело и антитело человека. Эти антитела могут быть получены с помощью известного способа.

В качестве примера химерного антитела, может быть указано антитело, в котором переменная и константная области антитела происходят из разных видов, например, химерное антитело, в котором переменная область антитела мыши или крысы соединена с константной областью человеческого антитела (см. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)).

В качестве примера гуманизованного антитела, может быть представлено антитело, полученное путем интеграции только определяющей комплементарности области (CDR), в антитело, происходящее от человека (см. Nature (1986) 321, pp. 522-525), и антитело, полученное путем прививки части аминокислотных остатков каркасной области, а также последовательности CDR к антителу человека с помощью способа прививки CDR (международная публикация № WO 90/07861).

Однако гуманизованное антитело, полученное из антитела TINA1, не ограничивается конкретным гуманизованным антителом, пока гуманизованное антитело имеет все 6 типов последовательностей CDR антитела TINA1. Переменная область тяжелой цепи антитела TINA1 имеет CDRH1 (TAGMQ), состоящую из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 23 в списке последовательностей, CDRH2 (WINTHSGVDPKYAEDFKG), состоящую из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 24 в списке последовательностей, и CDRH3 (SGFGSSYWFVDV), состоящую из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 25 в списке последовательностей. Кроме того, переменная область легкой цепи антитела TINA1 имеет CDRL1 (KASQDVSTAVA), состоящую из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 26 в списке последовательностей, CDRL2 (SASYRYT), состоящую из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 27 в списке последовательностей и CDRL3 (QQHYITPLT), состоящую из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 28 в списке последовательностей.

В качестве примера гуманизованного антитела TINA1 антитела мыши, может быть представлена произвольная комбинация тяжелой цепи, содержащей переменную область тяжелой цепи, состоящую из любой из (1) аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных остатков 20-140 SEQ ID NO: 12, 14 или 16 или аминокислотных остатков 1-121 SEQ ID NO: 45 в списке последовательностей, (2) аминокислотной последовательности, имеющей гомологию, по меньшей мере, 95% или более с аминокислотной последовательностью (1) описанной выше, и (3) аминокислотной последовательности, в которой одна или несколько аминокислот в аминокислотной последовательности (1), описанной выше, удалены, заменены или добавлены, и легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи, состоящую из любой из (4) аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных остатков





тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных положений 20-469 SEQ ID NO: 12, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных положений 21-234 SEQ ID NO: 18; антитело, состоящее из тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных положений 20-469 SEQ ID NO: 14, и легкой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных положений 21-234 SEQ ID NO: 18; антитело, состоящее из тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных положений 20-469 SEQ ID NO: 14, и легкой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных положений 21-234 SEQ ID NO: 20; и антитело, состоящее из тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных положений 20-469 SEQ ID NO: 16, и легкой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных положений 21-234 SEQ ID NO: 22.

Комбинируя последовательность, имеющую высокую гомологию с описанной выше аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, с последовательностью, имеющей высокую гомологию с описанной выше аминокислотной последовательностью легкой цепи, можно выбрать антитело, имеющее биологическую активность, эквивалентную активности каждого из описанных выше антител. Такая гомология обычно является гомологией 80% или более, предпочтительно, гомологией 90% или более, более предпочтительно, гомологией 95% или более, наиболее предпочтительно, гомологией 99% или более. Кроме того, путем комбинирования аминокислотной последовательности, в которой от одного до нескольких аминокислотных остатков заменены, удалены или добавлены в тяжелой цепи или легкой цепи аминокислотной последовательности, также возможно выбрать антитело, имеющее биологическую активность, эквивалентную активности каждого из вышеописанных антител.

Гомология между двумя аминокислотными последовательностями может быть определена с использованием параметров по умолчанию алгоритма Blast версии 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). Алгоритм Blast можно использовать также через Интернет, зайдя на сайт [ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://ncbi.nlm.nih.gov/blast).

В аминокислотной последовательности тяжелой цепи, представленной SEQ ID NO: 12, 14 или 16 в Списке последовательностей, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислотных остатков 1-19, является сигнальной последовательностью, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислотных остатков 20-140, является вариательной областью, и аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислотных остатков 141-470, является константной областью.

Кроме того, в аминокислотной последовательности легкой цепи, представленной SEQ ID NO: 18, 20 или 22 в Списке последовательностей, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислотных остатков 1-20, является сигнальной последовательностью, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислотных остатков 21-129, является вариательной областью, и аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислотных остатков 130-234, является константной областью.

Кроме того, антитело по изобретению включает антитело человека, которое связывается с TROP2. Анти-TROP2 антитело человека относится к антителу человека, имеющему только последовательность антитела, происходящего из хромосомы человека. Анти-TROP2 антитело человека может быть получено способом с использованием мыши-продуцента антитела человека, имеющей фрагмент человеческой хромосомы, содержащий гены тяжелой и легкой цепей антитела человека (см. Tomizuka, K. et al., *Nature Genetics* (1997) 16, pp. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., *Nucl. Acids Res.* (1998) 26, pp. 3447-3448; Yoshida, H. et al., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* vol. 10, pp. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, pp. 722-727, и т.д.).

Такая мышь, продуцирующая антитела человека, может быть создана следующим образом. Генетически модифицированное животное, у которого были разорваны локусы генов тяжелой и легкой цепи эндогенного иммуноглобулина, и вместо этого были введены локусы генов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина человека через вектор искусственной хромосомы дрожжей (YAC) или подобный, создается путем получения нокаутированного животного и трансгенного животного и спаривания этих животных.

Кроме того, в соответствии с способом рекомбинантной ДНК с использованием кДНК кодирующей каждую из такой тяжелой цепи и легкой цепи антитела человека, и, предпочтительно, вектора, содержащего такие кДНК, трансформируют эукариотические клетки, и трансформированные клетки, которые продуцируют рекомбинантные моноклональные антитела человека, культивируют, при этом антитело также может быть получено из супернатанта культуры.

В настоящем документе в качестве хозяина можно использовать, например, эукариотические клетки, предпочтительно клетки млекопитающих, такие как клетки СНО, лимфоциты или клетки миеломы.

Кроме того, также известен способ получения антитела человека, производного из фагового дисплея, выбранного из библиотеки антител человека (см. Wormstone, I. M. et al., *Investigative Ophthalmology*

& Visual Science. (2002) 43 (7), pp. 2301-2308; Carmen, S. et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), pp. 189-203; Siriwardena, D. et al., Ophthalmology (2002) 109 (3), pp. 427-431, и т. д.).

Например, может применяться способ фагового дисплея, в котором вариабельная область антитела человека экспрессируется на поверхности фага в виде одноцепочечного антитела (scFv), и выбирают фаг, который связывается с антигеном (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), pp. 1105-1116).

Путем анализа гена фага, выбранного на основе связывания с антигеном, можно определить последовательность ДНК, кодирующую вариабельную область антитела человека, которая связывается с антигеном.

Если определяют последовательность ДНК scFv, который связывается с антигеном, антитело человека может быть получено путем получения вектора экспрессии, содержащего последовательность, и введения вектора в подходящего хозяина для его экспрессии (международная публикация № WO 92/01047, WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388; Annu. Rev. Immunol. (1994) 12, pp. 433-455; Nature Biotechnology (2005) 23 (9), pp. 1105-1116).

Если вновь полученное антитело человека связывается с частичным пептидом или частичной третиной структуры, с которой связывается антитело TINA1, можно определить, что антитело человека связывается с тем же эпитопом, что и антитело TINA1. Кроме того, подтверждая, что антитело человека конкурирует с антителом TINA1 за связывание с TROP2 (т.е. антитело человека ингибирует связывание между антителом TINA1 и TROP2), можно определить, что антитело человека связывается с тем же эпитопом, что и антитело TINA1, даже если конкретная последовательность или структура эпитопа не были определены. Когда подтверждается, что антитело человека связывается с тем же эпитопом, что и антитело TINA1, строго ожидается, что антитело человека будет иметь биологическую активность, эквивалентную активности антитела TINA1.

Химерные антитела, гуманизированные антитела или антитела человека, полученные описанным выше способом, могут быть оценены на предмет свойства связывания с антигеном известным способом или подобным, и может быть выбрано предпочтительное антитело.

В качестве одного из примеров другого показателя для использования при сравнении свойств антител может быть представлена стабильность антител. Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC) представляет собой устройство, способное быстро и точно измерять температуру средней точки тепловой денатурации (Tm), которая используется в качестве благоприятного показателя относительной конформационной стабильности белков. Измеряя значения Tm с помощью DSC и сравнивая значения, можно сравнить разницу в термической стабильности. Известно, что стабильность антител при хранении показывает некоторую корреляцию с термостабильностью антител (Lori Burton, et. al., Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, pp. 265-273), и можно выбрать предпочтительное антитело, используя термическую стабильность в качестве показателя. Примеры других показателей для выбора антител включают следующие признаки: выход в подходящей клетке-хозяине является высоким; и способность к агрегации в водном растворе является низкой. Например, антитело, которое демонстрирует самый высокий выход, не всегда демонстрирует наивысшую термостабильность, и поэтому необходимо выбрать антитело, наиболее подходящее для введения человеку, путем проведения всесторонней оценки на основе вышеописанных показателей.

В настоящее изобретение также включен модифицированный вариант антитела. Модифицированный вариант относится к варианту, полученному путем химической или биологической модификации антитела по настоящему изобретению. Примеры химически модифицированного варианта включают варианты, химически модифицированные путем связывания химического фрагмента с аминокислотным скелетом, варианты, химически модифицированные N-связанной или O-связанной углеводной цепью и т. д. Примеры биологически модифицированного варианта включают варианты, полученные посттрансляционной модификацией (такой как N-связанное или O-связанное гликозилирование, N- или C-концевой процессинг, дезамидирование, изомеризация аспарагиновой кислоты или окисление метионина) и варианты, в которых метиониновый остаток добавляют к N-концу через экспрессию в прокариотической клетке-хозяине.

Кроме того, антитело, меченное так, чтобы сделать возможным обнаружение или выделение антитела или антигена по изобретению, например, ферментно-меченное антитело, флуоресцентно-меченное антитело и аффинно-меченное антитело, также включены в значение модифицированного варианта. Такой модифицированный вариант антитела по изобретению полезен для улучшения стабильности и удержания антитела в крови, снижения его антигенности, обнаружения или выделения антитела или антигена и так далее.

Кроме того, регулируя модификацию гликана, который связан с антителом по изобретению (гликозилирование, дефукозилирование и т.д.), можно усилить антителозависимую клеточную цитотоксическую активность. В качестве способа регулирования модификации гликана антител известны международные публикации № WO 1999/54342, WO 2000/61739, WO 2002/31140 и т.д. Однако методики ими не ограничиваются. В антитело по настоящему изобретению также включено антитело, в котором регулируется модификация гликана.

В случае, когда антитело получают путем сначала выделением гена антитела, и затем введением ге-

на в подходящего хозяина, можно использовать комбинацию подходящего хозяина и подходящего вектора экспрессии. Конкретные примеры гена антитела включают комбинацию гена, кодирующего последовательность тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем описании, и гена, кодирующего последовательность его легкой цепи. Когда клетка-хозяин трансформирована, можно вставить ген последовательности тяжелой цепи и ген последовательности легкой цепи в один и тот же вектор экспрессии, а также в разные векторы экспрессии по отдельности.

В случае, когда эукариотические клетки используют в качестве хозяина, могут использоваться клетки животных, клетки растений и эукариотические микроорганизмы. В качестве клеток животных могут быть представлены клетки млекопитающих, например, клетки COS обезьян (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), фибробласты NIH3T3 мыши (ATCC № CRL-1658) и штаммы с дефицитом дигидрофолатредуктазы (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) клеток яичников китайского хомячка (клетки CHO; ATCC: CCL- 61).

В случае использования прокариотических клеток, например, можно привести примеры *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*.

Антитело может быть получено путем введения гена желаемого антитела в эти клетки посредством трансформации и культивирования трансформированных таким образом клеток *in vitro*. В вышеописанном способе культивирования выход иногда может варьироваться в зависимости от последовательности антитела, и, следовательно, можно выбрать антитело, которое легко продуцируется в качестве фармацевтического препарата, используя выход в качестве показателя среди антител, имеющих эквивалентную связывающую активность. Следовательно, в антитело по настоящему изобретению также включено антитело, полученное способом получения антитела, характеризующимся включением стадии культивирования трансформированной клетки-хозяина и стадии сбора желаемого антитела из культивированного продукта, полученного на стадии культивирования.

Известно, что лизиновый остаток на карбоксильном конце тяжелой цепи антитела, продуцируемого в культивируемой клетке млекопитающего, удален (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), и также известно, что два аминокислотных остатка (глицин и лизин) на карбоксильном конце тяжелой цепи антитела, продуцируемого в культивируемой клетке млекопитающего, удаляются, и пролиновый остаток, вновь расположенный на карбоксильном конце, амидируется (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Однако такая делеция и модификация последовательности тяжелой цепи не влияют на аффинность связывания с антигеном и эффекторную функцию (активацию комплемента, антителозависимую клеточную цитотоксичность и т.д.) антитела. Следовательно, в антитело по настоящему изобретению также включены антитело, подвергшееся такой модификации, и функциональный фрагмент антитела, а также охватываются вариант с делецией, в котором одна или две аминокислоты удалены на карбоксильном конце тяжелой цепи, вариант, полученный амидированием варианта с делецией (например, тяжелой цепи, в которой амидирован карбоксильный концевой пролиновый остаток), и подобные. Тип варианта с делецией, имеющий делецию на карбоксильном конце тяжелой цепи антитела по изобретению, не ограничивается указанными выше вариантами, пока сохраняются аффинность связывания антигена и эффекторная функция. Две тяжелые цепи, составляющие антитело по изобретению, могут быть одного типа, выбранного из группы, состоящей из полноразмерной тяжелой цепи и вышеописанного варианта с делецией, или могут быть двух типов в комбинации, выбранной из них. На соотношение количества каждого варианта делеции может влиять тип культивируемых клеток млекопитающих, которые продуцируют антитело по изобретению, и условия культивирования, однако может быть представлен случай, когда один аминокислотный остаток на карбоксильном конце был удален в обоих двух тяжелых цепях, содержащихся в качестве основных компонентов в антителе по изобретению.

В качестве изоформа антитела по изобретению, например, могут быть представлены IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), и, предпочтительно, могут быть представлены IgG1 или IgG2.

Что касается биологической активности антитела, обычно, антигенсвязывающей активности, активности интернализации в клетках, экспрессирующих антиген, через связывание с антигеном, активности нейтрализации активности антигена, активности усиления активности антигена, в качестве примера могут быть представлены активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), активность комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) и активность антителозависимого клеточно-опосредованного фагоцитоза (ADCP). Функцией антитела по настоящему изобретению является активность связывания с TROP2, предпочтительно, активность интернализации в экспрессирующих TROP2 клетках через связывание с TROP2. Кроме того, антитело по настоящему изобретению может иметь активность ADCC, активность CDC и/или активность ADCP в дополнение к активности интернализации клетки.

Полученное антитело может быть очищено до гомогенности. Разделение и очистка антитела могут быть выполнены с использованием обычного способа разделения и очистки белков. Например, антитело может быть разделено и очищено путем подходящего селективного сортирования и сочетания колоночной хроматографии, фильтрации на фильтре, ультрафильтрации, осаждения солей, диализа, препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, электрофореза с изoeлектрической фокусировкой и подобных. (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds.,

Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), но способ ими не ограничивается.

Примеры такой хроматографии включают аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию, хроматографию с обращенной-фазой и адсорбционную хроматографию.

Такую хроматографию можно проводить с использованием жидкостной хроматографии, такой как HPLC или FPLC.

В качестве примера колонки для использования в аффинной хроматографии можно привести колонку с белком А и колонку с белком G. Например, в качестве примера колонки, использующей белок А, можно привести Nuper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia) и подобные.

Кроме того, используя носитель с иммобилизованным на нем антигеном, антитело также можно очистить, используя свойство связывания антитела с антигеном.

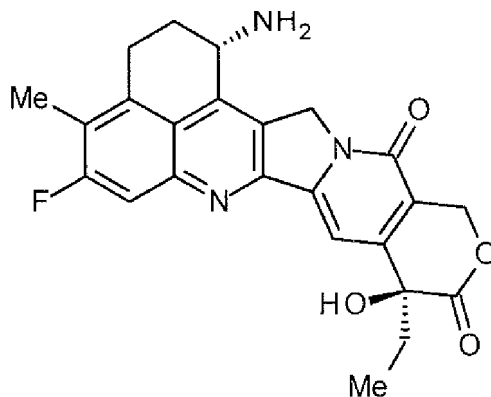
Противораковое соединение.

В этом разделе объясняется противоопухолевое соединение, которое должно быть конъюгировано с анти-TROP2 антителом как часть описанного конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению.

Противоопухолевое соединение, используемое в настоящем изобретении, особо не ограничивается, если оно является соединением, обладающим противоопухолевым действием и имеет группу заместителя, или частичную структуру, позволяющую соединяться с линкерной структурой. Когда часть или весь линкер расщепляется в опухолевых клетках, группа противоопухолевого соединения высвобождается, демонстрируя противоопухолевый эффект противоопухолевого соединения. Поскольку линкер расщепляется в месте соединения с лекарственным средством, противоопухолевое соединение высвобождается в своей не модифицированной структуре, проявляя свой собственный противоопухолевый эффект.

В качестве противоопухолевого соединения, используемого в настоящем изобретении, предпочтительно использовать экзатекан (((1S,9S)-1-амино-9-этил-5-фтор-2,3-дигидро-9-гидрокси-4-метил-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13(9H,15H)-дион; показанный в следующей формуле), одно из производных камптотецина. Экзатекан показан ниже в формуле 1.

Формула 1



Несмотря на то, что экзатекан обладает прекрасным противоопухолевым действием, он не продавался в качестве противоопухолевого препарата. Соединение можно легко получить известным способом, и аминогруппу в положении 1 можно предпочтительно использовать в качестве положения соединения с линкерной структурой. Кроме того, экзатекан также может высвобождаться в опухолевые клетки, в то время как часть линкера все еще прикреплена к ним, и он остается отличным противораковым соединением, проявляющим превосходный противоопухолевый эффект даже в такой структуре.

Поскольку экзатекан имеет структуру камптотецина, известно, что равновесие смещается к структуре с замкнутым лактоновым кольцом (замкнутым кольцом) в водной кислой среде (например, pH 3 или около того), но оно смещается к структуре с разомкнутым лактоновым кольцом (разомкнутое кольцо) в водной щелочной среде (например, pH 10 или около того). Также ожидается, что лекарственный конъюгат, вводимый с остатком экзатекана, соответствующим замкнутой кольцевой структуре и разомкнутой кольцевой структуре, будет иметь такое же противоопухолевое действие, и любое из этих состояний находится в пределах объема настоящего изобретения.

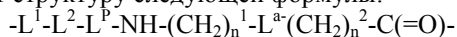
Другие примеры противоопухолевого соединения могут включать доксорубин, даунорубин, митомицин С, блеомицин, циклоцитидин, винкристин, винбластин, метотрексат, противоопухолевый агент на основе платины (цисплатин или его производные), таксол или его производные и камптотецин или его производные (противоопухолевые агенты, описанные в выложенном патенте Японии № 6-87746).

Что касается конъюгата антитело-лекарственное средство, количество конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу антитела является ключевым фактором, влияющим на эффективность и безопасность. Получение конъюгата антитело-лекарственное средство проводят путем определе-

ния условий реакции, включая количество используемых исходных материалов и реагентов для реакции, чтобы иметь постоянное количество конъюгированных молекул лекарственного средства, и конъюгат антитело-лекарственное средство обычно получают в виде смеси, содержащей разное количество конъюгированных молекул лекарственного средства, в отличие от химической реакции низкомолекулярного соединения. Количество лекарственных средств, конъюгированных в молекуле антитела, выражается или определяется средним значением, то есть, средним количеством конъюгированных молекул лекарственного средства. Если специально не указано иное в качестве принципа, количество конъюгированных молекул лекарственного средства означает среднее значение, за исключением случая, когда оно является конъюгатом антитело-лекарственное средство, имеющим определенное количество конъюгированных молекул лекарственного средства, которое включено в смесь конъюгата антитело-лекарственное средство, имеющую различное количество конъюгированных молекул лекарственного средства. Количество молекул экзатекана, конъюгированных с молекулой антитела, является контролируемым, и в качестве среднего количества конъюгированных молекул лекарственного средства на антитело, может быть присоединено от 1 до 10 экзатеканов. В некоторых вариантах осуществления, могут быть присоединены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 экзатеканов. Предпочтительно оно составляет от 2 до 8, более предпочтительно, от 3 до 8, и более предпочтительно, от 3,5 до 4,5 или 4. Между тем, специалист в данной области техники может разработать реакцию для конъюгирования необходимого количества молекул лекарственного средства с молекулой антитела на основе описания Примеров настоящей заявки, и позволяет получить конъюгат антитело-лекарственное средство с контролируемым числом молекул экзатекана.

Линкерная структура.

Что касается конъюгата анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, объясняется линкерная структура для конъюгирования противоопухолевого соединения с анти-TROP2 антителом. Линкер имеет структуру следующей формулы:



Антитело соединено с концом L (конец, противоположный соединению с L<sup>2</sup>), и противоопухолевое соединение соединено с карбонильной группой фрагмента -L<sup>a</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub><sup>2</sup>-C(=O)-.

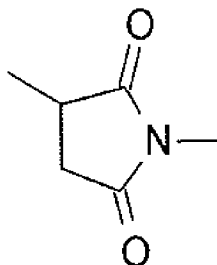
n<sup>1</sup> равно целому числу от 0 до 6 и, предпочтительно, равно целому числу от 1 до 5, и более предпочтительно, от 1 до 3.

L<sup>1</sup>.

L<sup>1</sup> представлен структурой -(сукцинимид-3-ил-N)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub><sup>3</sup>-C(=O)-.

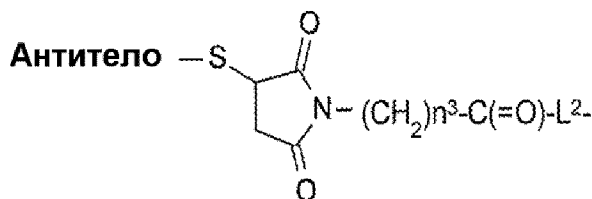
В приведенном выше примере n<sup>3</sup> равен целому числу от 2 до 8, и "-(сукцинимид-3-ил-N)-" имеет структуру, представленную следующей формулой:

Формула 2



Положение 3 указанной выше частичной структуры является соединительным положением с анти-TROP2 антителом. Связь с анти-TROP2 антителом в положении 3 характеризуется связыванием с образованием тиоэфира. Атом азота в положении 1 структурной группы соединен с атомом углерода метилена, который присутствует в линкере, включая структуру. В частности, -(сукцинимид-3-ил-N)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub><sup>3</sup>-C(=O)-L<sup>2</sup>- является структурой, представленной следующей формулой (в настоящем документе "антитело-S-" происходит от антитела).

Формула 3



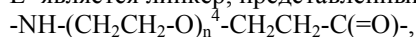
В формуле n<sup>3</sup> равен целому числу от 2 до 8, предпочтительно от 2 до 5. Конкретные примеры L<sup>1</sup> могут включать:

- (сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.



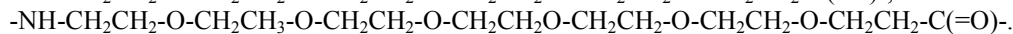
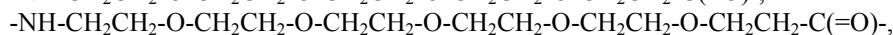
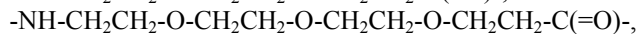
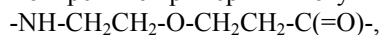
$L^2$ .

$L^2$  является линкер, представленный следующей структурой:



$L^2$  может отсутствовать, и в таком случае  $L^2$  является одинарной связью. Выше,  $n^4$  равен целому числу от 1 до 6 и, предпочтительно, от 2 до 4.  $L^2$  соединен с  $L^1$  по его концевой аминогруппе и соединен с  $L^P$  по его карбонильной группе на другом конце.

Конкретные примеры  $L^2$  могут включать:



$L^P$ .

$L^P$  является пептидным остатком, состоящим из 2-7 аминокислот. В частности, он состоит из олигопептидного остатка, в котором от 2 до 7 аминокислот связаны пептидной связью.  $L^P$  соединен с  $L^2$  на своем N-конце и соединен с аминогруппой  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n^1-\text{L}^a(\text{CH}_2)_n^2-\text{C}(=\text{O})-$  группы линкера на его конце C.

Аминокислота, составляющая  $L^P$  в линкере, особо не ограничивается, однако ее примеры включают L- или D-аминокислоту, предпочтительно L-аминокислоту. И, она может быть аминокислотой, имеющей структуру, такую как  $\beta$ -аланин,  $\epsilon$ -аминокапроновая кислота или  $\gamma$ -аминомасляная кислота в дополнении к  $\alpha$ -аминокислоте, кроме того, она может быть не природным типом аминокислоты, таким, как N-метилированная аминокислота.

Аминокислотная последовательность  $L^P$  особо не ограничивается, но примеры составляющей аминокислоты включают фенилаланин (Phe; F), тирозин (Tyr; Y), лейцин (Leu; L), глицин (Gly; G), аланин (Ala; A), валин (Val; V), лизин (Lys; K), цитруллин (Cit), серин (Ser; S), глутаминовую кислоту (Glu; E) и аспарагиновую кислоту (Asp; D).

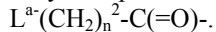
Среди них предпочтительные примеры включают фенилаланин, глицин, валин, лизин, цитруллин, серин, глутаминовую кислоту и аспарагиновую кислоту. В зависимости от типа аминокислоты можно контролировать характер высвобождения лекарственного средства. Количество аминокислот может составлять от 2 до 7.

Конкретные примеры  $L^P$  могут включать:



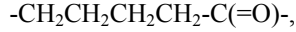
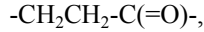
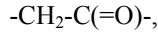
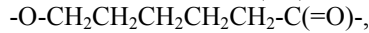
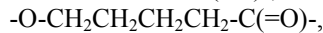
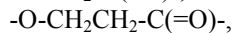
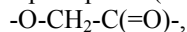
Вышеупомянутым "(D-) D" является D-аспарагиновая кислота.

Особенно предпочтительные примеры  $L^P$  для конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению может включать в себя тетрапептидный остаток -GGFG-



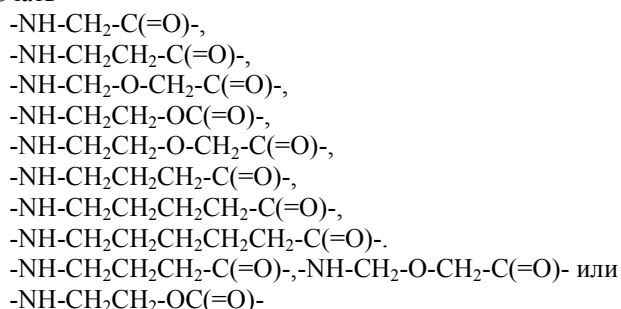
$L^a$  в  $\text{L}^a(\text{CH}_2)_n^2-\text{C}(=\text{O})-$  является структурой -O- или одинарной связью,  $n^2$  равен целому числу от 0 до 5, более предпочтительно, от 0 до 3, более предпочтительно, от 0 или 1.

Примеры  $\text{L}^a(\text{CH}_2)_n^2-\text{C}(=\text{O})-$  могут включать те, которые имеют следующие структуры:



Из них предпочтительным является  $-O-CH_2-C(=O)-$ ,  $-O-CH_2CH_2-C(=O)-$  или случай, когда  $L^a$  является одинарной связью, и  $n^2$  равно 0.

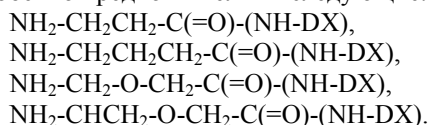
Конкретные примеры структуры, представленной  $-NH-(CH_2)_n^1-L^a(CH_2)_n^2-C(=O)-$  в линкере, могут включать



являются предпочтительными.

В линкере длина цепи  $-NH-(CH_2)_n^1-L^a(CH_2)_n^2-C(=O)-$  предпочтительно является цепью длиной от 4 до 7 атомов, и более предпочтительно, цепью длиной 5 или 6 атомов.

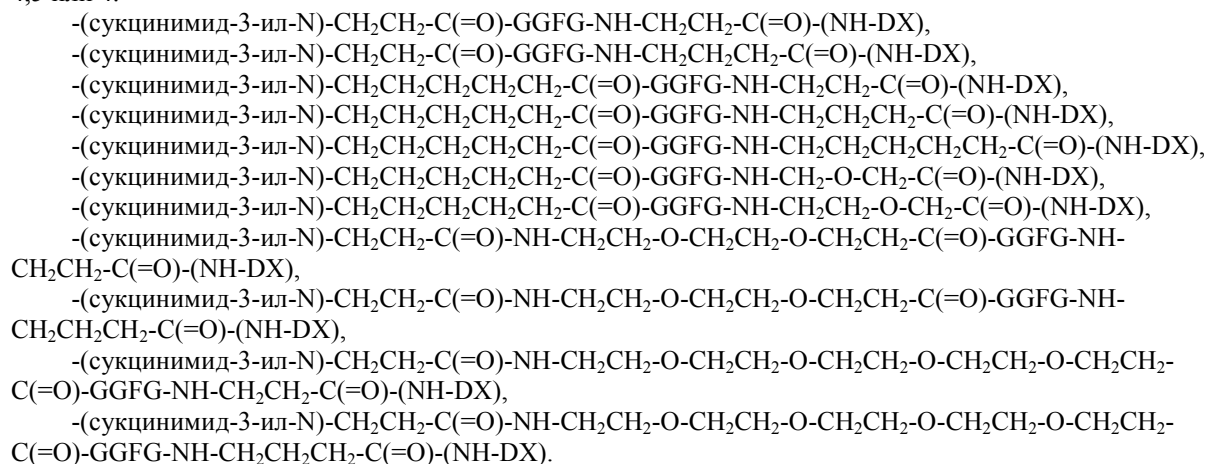
Что касается конъюгата анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, считается, что когда конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство переносится внутрь опухолевых клеток, линкерный фрагмент отщепляется и производное лекарственного средства, имеющее структуру, представленную  $NH_2-(CH_2)_n^1-L^a(CH_2)_n^2-C(=O)-(NH-DX)$ , высвобождается для проявления противоопухолевого действия. Примеры противоопухолевого производного, проявляющего противоопухолевый эффект за счет высвобождения из конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, включают противоопухолевое производное, имеющее структурную составляющую, в которой структура, представленная  $-NH-(CH_2)_n^1-L^a(CH_2)_n^2-C(=O)-$  линкера, имеет концевую аминогруппу, и особенно предпочтительны следующие.



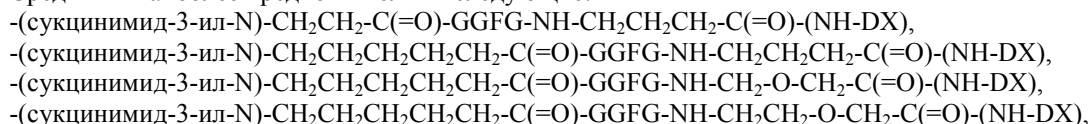
Между тем, в случае  $NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$  было подтверждено, что, поскольку амидная структура в молекуле нестабильна, она снова подвергается саморазложению с выделением следующего:  $HO-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ .

Эти соединения также можно предпочтительно использовать в качестве промежуточного продукта для получения конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению.

Для конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором экзатекан используют в качестве лекарственного средства, предпочтительно, чтобы структурная группа лекарственного средство-линкер  $[-L^1-L^2-L^p-NH-(CH_2)_n^1-L^a(CH_2)_n^2-C(=O)-(NH-DX)]$ , имеющая следующую структуру, была связана с антителом. Среднее количество конъюгированных групп указанной структуры лекарственное средство-линкер на антитело может составлять от 1 до 10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Предпочтительно, от 2 до 8, более предпочтительно, от 3 до 8, и более предпочтительно, от 3,5 до 4,5 или 4.



Среди них наиболее предпочтительны следующие:



- (сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Особенно предпочтительны следующие:

- (сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Что касается линкерной структуры для конъюгирования анти-TROP2 антитела и лекарственного средства в конъюгате антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, предпочтительный линкер может быть сконструирован путем соединения предпочтительных структур, показанных для каждой части линкера, описанного выше. Что касается линкерной структуры, предпочтительно использовать линкеры со следующей структурой. Между тем, левый конец структуры является соединительным положением с антителом, а правый конец является соединительным положением с лекарственным средством.

- (сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

Среди них наиболее предпочтительны следующие:

- (сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

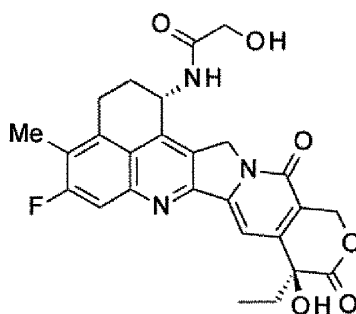
Особенно предпочтительны следующие:

- (сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

Что касается конъюгата анти-TROP2 антитело-лекарственное средство, используемого в настоящем изобретении, когда он переносится внутрь опухолевых клеток, линкерный фрагмент расщепляется и может высвобождаться производное лекарственного средства, имеющее структуру, представленную формулой: NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX). Было подтверждено, что, поскольку аминальная структура в молекуле производного лекарственного средства нестабильна, она снова подвергается саморазложению с высвобождением соединения, представленного формулой: HO-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Соединение может быть представлено следующей формулой:

Формула 4



(далее также именуемое "Соединение 1" в настоящем изобретении).

Соединение 1 считается основным фармацевтически активным веществом с противоопухолевой активностью, которым обладает конъюгат антитело-лекарственное средство, используемый в настоящем изобретении, и было подтверждено его ингибирующее действие на топоизомеразу I (Ogitani Y. et al., *Clinical Cancer Research*, 2016, Oct 15; 22 (20):5097-5108, Epub 2016 Mar 29).

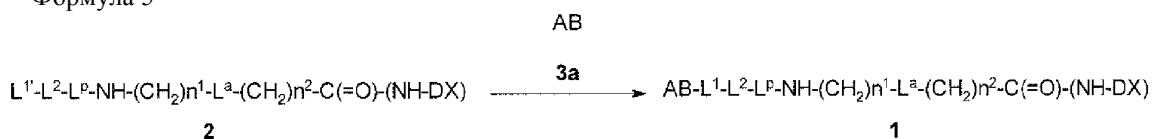
Способы получения.

Далее дается объяснение типового способа получения конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению или промежуточного продукта его получения. Между тем, соединения в настоящем документе описаны ниже с номером соединения, указанным в каждой формуле реакции. В частности, они упоминаются как "соединение формулы (1)", "соединение (1)" или подобные. Соединения с номерами, отличными от указанных, также описаны аналогично.

Способ получения А.

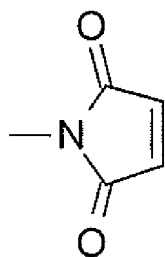
Конъюгат антитело-лекарственное средство, представленный формулой (1), который связан со структурой лекарственное средство-линкер через тиоэфир, может быть получен, например, следующим способом.

Формула 5



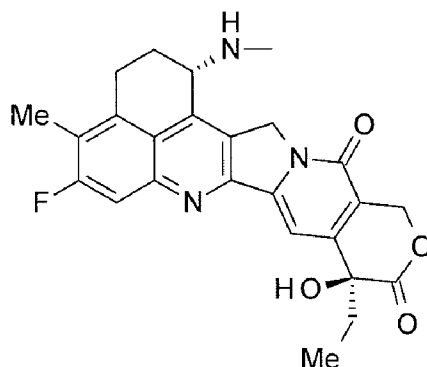
В формуле АВ является антителом, имеющим сульфгидрильную группу, а  $L^1$  является линкерной структурой  $L^1$ , в которой конец линкера является малеимидильной группой (формула показана ниже).

Формула 6



В формуле атом азота является соединяющим положением и, в частности, является группой, в которой группа -(сукцинимид-3-ил-N)- в -(сукцинимид-3-ил-N)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub><sup>3</sup>-C(=O)-L<sup>1</sup> является малеимидильной группой. Кроме того, -(NH-DX) является структурой, представленной следующей формулой:

Формула 7



и он является группой, полученной удалением одного атома водорода аминогруппы в положении 1

экзатекана.

Кроме того, соединение формулы (1) в приведенной выше формуле реакции интерпретируется как структура, в которой одна структурная группа, идущая от лекарственного средства к линкерному концу, соединяется с одним антителом. Однако это описание дано только для удобства, и на самом деле существует много случаев, в которых множество структурных групп связано с одной молекулой антитела. То же самое относится к объяснению способа получения, описанного ниже.

Конъюгат антитело-лекарственное средство (1) может быть получен реакцией соединения (2), которое можно получить описанным ниже способом, с антителом (3а), имеющим сульфгидрильную группу.

Антитело (3а), имеющее сульфгидрильную группу, может быть получено способом, хорошо известным в данной области техники (Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)). Примеры включают: реагент Траута взаимодействует с аминогруппой антитела; N-сукцинимидил-S-ацетилтиоалканоаты взаимодействуют с аминогруппой антитела с последующей реакцией с гидроксиламином; после реакции с N-сукцинимидил-3-(пиридилдитио)пропионатом, антитело взаимодействует с восстанавливающим агентом; антитело взаимодействует с восстанавливающим агентом, таким как дитиотреитол, 2-меркаптоэтанол и гидроклорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР) для восстановления дисульфидной связи в антителе с образованием сульфгидрильной группы, но не ограничиваются ими.

В частности, используя от 0,3 до 3 молярных эквивалентов ТСЕР в качестве восстанавливающего агента на дисульфид в антителе, и взаимодействуя с антителом в буферном растворе, содержащем хелатирующий агент, можно получить антитело с частично или полностью восстановленным дисульфидом в антителе. Примеры хелатирующего агента включают этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) и диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DTPA). Его можно использовать в концентрации от 1 мМ до 20 мМ. Примеры буферного раствора, который можно использовать, включают раствор фосфата натрия, бората натрия или ацетата натрия. В частности, взаимодействием антитела с ТСЕР при от 4 до 37°C в течение от 1 до 4 часов, может быть получено антитело (3а), имеющее частично или полностью восстановленную сульфгидрильную группу.

Между тем, реакцией добавления сульфгидрильной группы к группе лекарство-линкер, группу лекарственное средство-линкер можно конъюгировать тиозфирной связью.

Используя от 2 до 20 молярных эквивалентов соединения (2) на антитело (3а), имеющих сульфгидрильную группу, можно получить конъюгат антитело-лекарственное средство (1), в котором на одно антитело конъюгировано от 2 до 8 молекул лекарственного средства. В частности, для реакции достаточно, чтобы раствор, содержащий растворенное в нем соединение (2), был добавлен к буферному раствору, содержащему антитело (3а), имеющее сульфгидрильную группу. В настоящем документе примеры буферного раствора, который можно использовать, включают раствор ацетата натрия, фосфата натрия и бората натрия. pH реакции составляет от 5 до 9, и более предпочтительно, реакцию проводят при примерно pH 7. Примеры растворителя для растворения соединения (2) включают органический растворитель, такой как диметилсульфоксид (DMSO), диметилформамид (DMF), диметилацетамид (DMA) и N-метил-2-пиридон (NMP).

Достаточно, чтобы раствор органического растворителя, содержащий растворенное в нем соединение (2), был добавлен в количестве от 1 до 20% об./об. к буферному раствору, содержащему антитело (3а), имеющее сульфгидрильную группу, для реакции. Температура реакции составляет от 0 до 37°C, более предпочтительно, от 10 до 25°C, и время реакции составляет от 0,5 до 2 ч. Реакция может быть прекращена путем деактивации реакционной способности непрореагировавшего соединения (2) с помощью тиолсодержащего реагента. Примеры тиолсодержащего реагента включают цистеин и N-ацетил-L-цистеин (НАС). Более конкретно, к используемому соединению (2) добавляют 1-2 молярных эквивалента НАС и, инкубируя при комнатной температуре в течение 10-30 мин, реакцию останавливают.

Полученный конъюгат антитело-лекарственное средство (1) может быть подвергнут, после концентрации, замене буфера, очистке и измерению концентрации антитела и среднего числа конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу антитела в соответствии с общими методиками, описанными ниже, идентификации конъюгата антитело-лекарственное средство (1).

Обычная процедура А: концентрация водного раствора антитела или конъюгата антитело-лекарственное средство.

В контейнер Amicon Ultra (50 000 MWCO, Millipore Corporation) добавляют раствор антитела или конъюгата антитело-лекарственное средство, и раствор антитела или конъюгата антитело-лекарственное средство концентрируют центрифугированием (центрифугирование в течение 5-20 мин при от 2000 G до 3800 G) с помощью центрифуги (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.).

Общая процедура В: Измерение концентрации антител.

Используя УФ-датчик (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), измерение концентрации антител проводят в соответствии с способом, определенным производителем. При этом используют коэффициент абсорбции 280 нм, разный для каждого антитела (от 1,3 мл мг<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> до 1,8 мл мг<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>).

Общая процедура С-1: замена буфера для антитела.

Колонку NAP-25 (кат. № 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) с использованием носителя

Sephadex G-25 уравнивают фосфатным буфером (10 мМ, рН 6,0; обозначен как PBS6.0/EDTA в спецификации), содержащим хлорид натрия (137 мМ) и этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA, 5 мМ) в соответствии со способом, определенным производителем. Водный раствор антитела наносят в количестве 2,5 мл на одну колонку NAP-25, и затем собирают фракцию (3,5 мл), элюированную 3,5 мл PBS6.0/EDTA. Полученную фракцию концентрируют с помощью общей процедуры А. После измерения концентрации антитела с помощью общей процедуры В, концентрацию антитела доводят до 10 мг/мл, используя PBS6.0/EDTA.

Общая процедура С-2: замена буфера для антитела.

Колонку NAP-25 (кат. № 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) с использованием носителя Sephadex G-25 уравнивают фосфатным буфером (50 мМ, рН 6,5; обозначен как PBS6,5/EDTA в спецификации), содержащим хлорид натрия (50 мМ) и EDTA (2 мМ) в соответствии с способом, определенным производителем. Водный раствор антитела наносят в количестве 2,5 мл на одну колонку NAP-25, и затем собирают фракцию (3,5 мл), элюированную 3,5 мл PBS6,5/EDTA. Полученную фракцию концентрируют с помощью общей процедуры А. После измерения концентрации антитела с использованием общей процедуры В, концентрацию антитела доводят до 20 мг/мл, используя PBS6,5/EDTA.

Общая процедура D: очистка конъюгата антитело-лекарственное средство.

Колонку NAP-25 уравнивают любым буфером, выбранным из коммерчески доступного фосфатного буфера (PBS7.4, кат. № 10010-023, Invitrogen), натрий-фосфатного буфера (10 мМ, рН 6,0; обозначен как PBS6.0), содержащего хлорид натрия (137 мМ), и ацетатного буфера, содержащего сорбит (5%) (10 мМ, рН 5,5; в описании он обозначен ABS). Водный раствор реакции конъюгата антитело-лекарственное средство наносят в количестве примерно 1,5 мл на колонку NAP-25, и затем элюируют буфером в количестве, определенном производителем, для сбора фракции антитела. Собранную фракцию снова наносят на колонку NAP-25 и, повторяя в целом 2-3 раза процесс очистки гель-фильтрацией для элюирования буфером, получают конъюгат антитело-лекарственное средство, исключая не конъюгированный линкер лекарственного средства и низкомолекулярное соединение (гидрохлорид трис(2-карбокситил)фосфина (TCEP), N-ацетил-L-цистеин (NAC) и диметилсульфоксид).

Общая процедура E: измерение концентрации антитела в конъюгате антитело-лекарственное средство и среднего числа конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу антитела (1).

Концентрация конъюгированного лекарственного средства в конъюгате антитело-лекарственное средство может быть рассчитана путем измерения УФ абсорбции водного раствора конъюгата антитело-лекарственное средство на двух длинах волн 280 нм и 370 нм с последующим выполнением расчетов, показанных ниже.

Поскольку полная абсорбция на любой длине волны равно сумме абсорбции каждого светопоглощающего химического вещества, присутствующего в системе (аддитивность абсорбции), если молярные коэффициенты абсорбции антитела и лекарственного средства остаются одинаковыми до и после конъюгации между антителом и лекарственным средством, концентрация антитела и концентрация лекарственного средства в конъюгате антитело-лекарственное средство выражают следующими уравнениями.

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

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

В вышеуказанном,  $A_{280}$  является оптической плотностью водного раствора конъюгата антитело-лекарственное средство при 280 нм,  $A_{370}$  является оптической плотностью водного раствора конъюгата антитело-лекарственное средство при 370 нм,  $A_{A,280}$  является оптической плотностью антитела при 280 нм,  $A_{A,370}$  является оптической плотностью антитела при 370 нм,  $A_{D,280}$  является оптической плотностью предшественника конъюгата при 280 нм,  $A_{D,370}$  является оптической плотностью предшественника конъюгата при 370 нм,  $\epsilon_{A,280}$  является молярным коэффициентом абсорбции антитела при длине волны 280 нм,  $\epsilon_{A,370}$  является молярным коэффициентом абсорбции антитела при длине волны 370 нм,  $\epsilon_{D,280}$  является молярным коэффициентом абсорбции конъюгата предшественника при 280 нм,  $\epsilon_{D,370}$  является молярным коэффициентом абсорбции предшественника конъюгата при 370 нм,  $C_A$  является концентрацией антитела в конъюгате антитело-лекарственное средство, и  $C_D$  является концентрацией лекарственного средства в конъюгате антитело-лекарственное средство.

Что же касается  $\epsilon_{A,280}$ ,  $\epsilon_{A,370}$ ,  $\epsilon_{D,280}$  и  $\epsilon_{D,370}$  в вышеуказанном, используют предварительно полученные значения (оцененное значение на основе расчета или измерения значения, полученного с помощью УФ измерения соединения). Например,  $\epsilon_{A,280}$  может быть оценена из аминокислотной последовательности антитела, с использованием известного способа расчета (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423).  $\epsilon_{A,370}$  обычно равна нулю.  $\epsilon_{D,280}$  и  $\epsilon_{D,370}$  может быть получена на основании закона Ламберта-Бера (Абсорбция=молярная концентрация x молярный коэффициент абсорбции x длину пути клеток) путем измерения оптической плотности раствора, в котором используемый предшественник конъюгата быть использован для растворения при определенной молярной концентрации. Измеряя  $A_{280}$  и  $A_{370}$  водного раствора конъюгата антитело-лекарственное средство и решая одновременные уравнения (I) и (II) с использованием значений, можно получить  $C_A$  и  $C_D$ . Кроме того, изменяя  $C_D$  на  $C_A$ , можно получить среднее количество конъюгированного лекарственного средства на антитело.

Общая процедура F. Измерение среднего количества конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу антитела в конъюгате антитело-лекарственное средство - (2).

Среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу антитела в конъюгате антитело-лекарственное средство также может быть определено с помощью анализа высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) с использованием способа, описанного ниже, в дополнение к вышеупомянутой Общей процедуре E.

F-1. Получение образца для анализа HPLC (восстановление конъюгата антитело-лекарственное средство).

Раствор конъюгата антитело-лекарственное средство (примерно 1 мг/мл, 60 мкл) смешивают с водным раствором дитиотреитола (DTT) (100 мМ, 15 мкл). Смесь инкубируют при 37°C в течение 30 мин, чтобы расщепить дисульфидную связь между L-цепью и H-цепью конъюгата антитело-лекарственное средство. Полученный образец используют для анализа HPLC.

F-2. Анализ HPLC.

Анализ HPLC проводят при следующих условиях измерения:

Система HPLC: система HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies, Inc.)

Датчик: УФ абсорбционный спектрометр (длина волны измерения: 280 нм)

Колонка: PLRP-S (2,1×50 мм, 8 мкм, 1000 ангстрем; Agilent Technologies, Inc., P/N PL1912-1802)

Температура колонки: 80°C

Подвижная фаза А: 0,04% водный раствор трифторуксусной кислоты (TFA).

Подвижная фаза В: раствор ацетонитрила, содержащий 0,04% TFA.

Градиентная программа: 29-36% (0 мин-12,5 мин), 36-42% (12,5-15 мин), 42-29% (15 мин-15,1 мин), 29-29% (15,1 мин-25 мин)

Объем впрыска образца: 15 мкл

F-3. Анализ данных.

F-3-1. По сравнению с L цепью ( $L_0$ ) и H цепью ( $H_0$ ) не конъюгированного антитела, L цепь, конъюгированная с лекарственным средством (L цепь, соединенная с одной молекулой лекарственного средства:  $L_1$ ) и H цепь (H цепь, соединенная с одной молекулой лекарства:  $H_1$ , H цепь, соединенная с двумя молекулами лекарства:  $H_2$ , H цепь, соединенная с тремя молекулами лекарства:  $H_3$ ) проявляют более высокую гидрофобность пропорционально количеству конъюгированных молекул лекарственного средства и, таким образом, имеют большее время удерживания. Следовательно, эти цепи элюируются в порядке  $L_0$  и  $L_1$  или  $H_0$ ,  $H_1$ ,  $H_2$  и  $H_3$ . Пики обнаружения могут быть отнесены к любому из  $L_0$ ,  $L_1$ ,  $H_0$ ,  $H_1$ ,  $H_2$  и  $H_3$  путем сравнения времени удерживания с  $L_0$  и  $H_0$ .

F-3-2. Поскольку линкер лекарственного средства имеет УФ поглощение, значения площади пика корректируют в ответ на количество конъюгированных молекул линкера лекарственного средства в соответствии со следующим выражением с использованием молярных коэффициентов поглощения L цепи, H цепи и линкера лекарственного средства.

Выражение 11

Скорректированное значение площади пика L цепи ( $L_i$ )

= Площадь пика x

Коэффициент молярного возбуждения L цепи

÷ (Коэффициент молярного возбуждения L цепи + количество конъюгированных молекул лекарственного средства x Коэффициент молярного возбуждения линкера лекарственного средства)

Выражение 2

Скорректированное значение площади пика H цепи ( $H_i$ )

= Площадь пика x

Коэффициент молярного возбуждения H цепи

÷ (Коэффициент молярного возбуждения H цепи + количество конъюгированных молекул лекарственного средства x Коэффициент молярного возбуждения линкера лекарственного средства)

В настоящем документе, что касается коэффициента молярного возбуждения (280 нм) L цепи или H цепи каждого антитела, может применяться значение, оцененное на основе аминокислотной последовательности L цепи или H цепи каждого антитела с помощью известного способа расчета (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). В случае hTINA, молярный коэффициент возбуждения 34690 и молярный коэффициент возбуждения 95000 используют в качестве оценочных значений для L цепи и H цепи, соответственно, в соответствии с ее аминокислотной последовательностью. Что касается молярного коэффициента возбуждения (280 нм) лекарственного линкера, используют измеренный молярный коэффициент возбуждения (280 нм) соединения, в котором малеимидная группа была преобразована в тиозфир сукцинимидом реакцией каждого лекарственного линкера с меркаптоэтанолом или N-ацетилцистеином.

F-3-3. Отношение площадей пиков (%) каждой цепи рассчитывают как сумму скорректированных значений площадей пиков согласно следующему выражению.

Выражение 3

$$\text{Соотношение площади пика L цепи} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

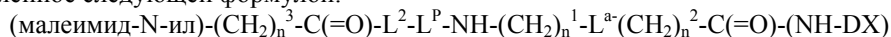
$$\text{Соотношение площади пика H цепи} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

$A_{Li}$ ,  $A_{Hi}$ : скорректированные значения соответствующих площадей пика  $L_i$  и  $H_i$ .

F-3-4. Среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу анти-тела в конъюгате антитело-лекарственное средство рассчитывают согласно следующему выражению.

Среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства=(отношение площадей пика  $L_0 \times 0$ +отношение площадей пика  $L_0 \times 1$ +отношение площадей пика  $H_0 \times 0$ +отношение площадей пика  $H_1 \times 1$ +отношение площадей пика  $H_2 \times 2 + H_3$  отношение площадей пиков  $\times 3$ )/ $100 \times 2$ .

Соединением, представленным формулой (2) в способе получения 1, является соединение, представленное следующей формулой:



В формуле

$n^3$  является целое число от 2 до 8,

$L^2$  является  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$  или одинарной связью, где  $n^4$  равен целому числу от 1 до 6,

$L^p$  является пептидный остаток, состоящий из 2-7 аминокислот, выбранных из фенилаланина, глицина, валина, лизина, цитруллина, серина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты.

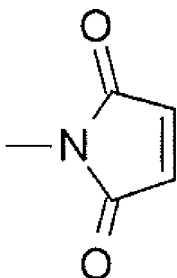
$n^1$  равен целому числу от 0 до 6,

$n^2$  равен целому числу от 0 до 5,

$L^a$  является  $-\text{O}-$  или одинарной связью,

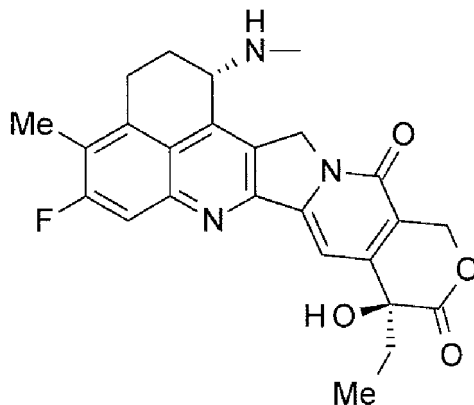
(maleimide-N-ил) - является maleimidильной группой (2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ильной группой), представленной следующей формулой:

Формула 8



где атом азота является соединительным положением,  $-(\text{NH-DX})$  является группой, представленной следующей формулой:

Формула 9



где атом азота аминогруппы в положении 1 является соединительным положением.

Когда  $L^2$  является одинарной связью или  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ , соединение, в котором  $n$  равен целому числу от 2 до 4, является предпочтительным в качестве промежуточного соединения.

Что касается пептидного остатка  $L^p$ , соединение, имеющее пептидный остаток, включающий аминокислоту, выбранную из фенилаланина, глицина, валина, лизина, цитруллина, серина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, является предпочтительным в качестве промежуточного соединения. Среди этих пептидных остатков, соединение, в котором  $L^p$  является пептидным остатком, состоящим из 4 аминокислот, является предпочтительным в качестве промежуточного соединения. Более конкретно, соединение, в котором  $L^p$  является тетрапептидным остатком  $-\text{GGFG}-$ , является предпочтительным в качестве промежуточного соединения для получения.

Далее, что касается  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n^1-\text{L}^a-(\text{CH}_2)_n^2-$ , соединение, содержащее  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  или  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  является предпочтительным в качестве промежуточного соединения. Соединение, содержащее  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  или  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ , является более предпочтительным.

Кроме того, в соединении, представленном формулой (2), соединение, в котором  $n^3$  равен целому числу от 2 до 5,  $L^2$  является одинарной связью и  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n^1-\text{L}^a-(\text{CH}_2)_n^2-$  является  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-$



$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  или  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  предпочтительны в качестве промежуточного продукта. Соединение, в котором  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n^1-\text{L}^a(\text{CH}_2)_n^2-$  является  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  или  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  является более предпочтительным. Кроме того, предпочтительным является соединение, в котором  $n^3$  равен целому числу 2 или 5.

Кроме того, в соединении, представленном формулой (2), соединение, в котором  $n^3$  равен целому числу от 2 до 5,  $\text{L}^2$  является  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $n^4$  является целым числом от 2 до 4, и  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n^1-\text{L}^a(\text{CH}_2)_n^2-$  является  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  или  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  является предпочтительным в качестве промежуточного продукта для получения. Соединение, в котором  $n^4$  равен целому числу 2 или 4, является более предпочтительным. Соединение, в котором  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n^1-\text{L}^a(\text{CH}_2)_n^2-$  является  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  или  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  является более предпочтительным.

В качестве таких предпочтительных промежуточных продуктов, используемых при получении соединения по настоящему изобретению, можно привести следующие примеры.

(малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ,  
 (малеимид-N-ил)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ .

Конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению может быть получен путем взаимодействия лекарственного средства-линкерного соединения, выбранного из вышеописанной группы промежуточных соединений, с анти-TROP2 антителом или его реакционноспособным производным и образования тиоэфирной связи на сайте дисульфидной связи, присутствующем в анти-TROP2 антителе. В этом случае предпочтительно использовать реакционноспособное производное анти-TROP2 антитела. В частности, предпочтительным является реакционноспособное производное, полученное путем восстановления анти-TROP2 антитела.

Следующие ниже соединения являются более предпочтительными в качестве промежуточных продуктов.

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

(малеимид-N-ил)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(малеимид-N-ил)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Среди описанной выше группы промежуточных соединений соединение, представленное следующей формулой:

(малеимид-N-ил)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(малеимид-N-ил)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), или

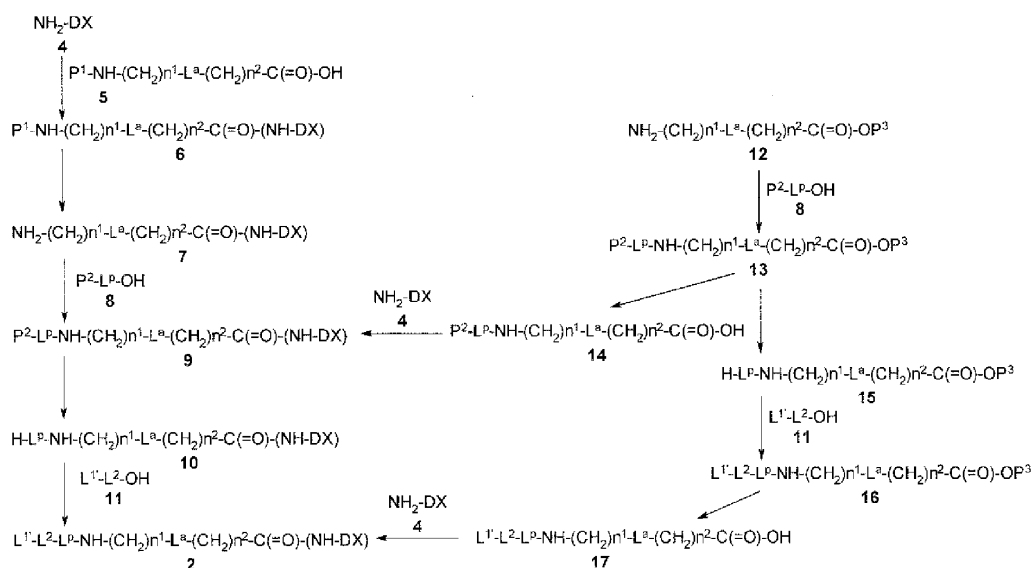
(малеимид-N-ил)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), является еще одним предпочтительным соединением.

Чтобы обеспечить количество конъюгата, множество конъюгатов, полученных в аналогичных условиях производства, чтобы иметь эквивалентное количество лекарственных средств (например, примерно ±1), можно смешать для приготовления новых партий. В этом случае среднее количество лекарственных средств находится между средним количеством лекарственных средств в конъюгатах до смешивания.

Способ получения 2.

Соединение, представленное формулой (2) в качестве промежуточного продукта, использованное в предыдущем способе получения, и его фармакологически приемлемая соль могут быть получены, например, следующим способом.

Формула 10



В формуле L<sup>1</sup> является малеимидильной группой, и каждый из P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> и P<sup>3</sup> является защитной группой.

Соединение (6) может быть получено путем дериватизации карбоновой кислоты (5) до активного сложного эфира, смешанного ангидрида кислоты, галогенангидрида или подобного, и его взаимодействием с NH<sub>2</sub>-DX (4) или его фармакологически приемлемой солью в присутствии основания. NH<sub>2</sub>-DX (4) является экзатеканом (химическое название: (1S,9S)-1-амино-9-этил-5-фтор-2,3-дигидро-9-гидрокси-4-метил-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13(9H,15H)-дион).

Для реакции можно использовать реакционные реагенты и условия, которые обычно используют для синтеза пептидов. Существуют различные виды активного сложного эфира. Например, его можно получить взаимодействием фенолов, таких как п-нитрофенол, N-гидроксibenзотриазол, N-гидроксисукцинимид или подобные, с карбоновой кислотой (5) с использованием конденсирующего агента, такого как N,N'-дициклогексилкарбодиимид или гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Кроме того, активный сложный эфир можно также получить реакцией карбоновой кислоты (5) с пентафторфенилтрифторацетатом или подобными; реакцией карбоновой кислоты (5) с гексафторфосфитом 1-бензотриазолилоситрипирролидинофосфония; реакцией карбоновой кислоты (5) с диэтилцианофосфонатом (способ высаливания); реакцией карбоновой кислоты (5) с трифенилфосфином и 2,2'-дипиридилдисульфидом (способ Мукаями); реакцией карбоновой кислоты (5) с производным триазина, таким как хлорид 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолина (DMTMM); или подобными. Кроме того, реакцию можно также проводить, например, способом галогенангидрида, при котором карбоновую кислоту (5) обрабатывают галогенангидридом, таким как тионилхлорид и оксалилхлорид, в присутствии основания.

При взаимодействии активного сложного эфира, смешанного ангидрида кислоты или галогенангидрида карбоновой кислоты (5), полученного, как указано выше, с соединением (4) в присутствии подходящего основания в инертном растворителе при температуре реакции от  $-78^{\circ}\text{C}$  до  $150^{\circ}\text{C}$ , может быть получено соединение (6). Между тем, "инертный растворитель" указывает на растворитель, который не ингибирует целевую реакцию, для которой используется растворитель.

Конкретные примеры основания, используемого для каждой стадии, описанной выше, могут включать карбонат, алкоксид, гидроксид или гидрид щелочного или щелочноземельного металла, включая карбонат натрия, карбонат калия, этоксид натрия, бутоксид калия, гидроксид натрия, гидроксид калия, гидрид натрия и гидрид калия, металлоорганическое основание, представленное алкиллитием, включая *n*-бутиллитий, диалкиламинолитием, включая диизопропиламин лития; металлоорганическое основание бисилиламина, включая бис(триметилсил)амид лития; и органическое основание, включая третичный амин или азотсодержащее гетероциклическое соединение, такое как пиридин, 2,6-лутидин, коллидин, 4-диметиламинопиридин, триэтиламин, *N*-метилморфолин, диизопропилэтиламин и диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (DBU).

Примеры инертного растворителя, который используется для реакции по настоящему изобретению, включают галогенированный углеводородный растворитель, такой как дихлорметан, хлороформ и четыреххлористый углерод; эфирный растворитель, такой как тетрагидрофуран, 1,2-диметоксиэтан и диоксан; ароматический углеводородный растворитель, такой как бензол и толуол; и амидный растворитель, такой как *N,N*-диметилформамид, *N,N*-диметилацетамид и *N*-метилпирролидин-2-он. В дополнение к ним, может использоваться сульфоксидный растворитель, такой как диметилсульфоксид и сульфан; кетоновый растворитель, такой как ацетон и метилэтилкетон; и, в некоторых случаях, спиртовой растворитель, такой как метанол и этанол. Кроме того, эти растворители можно смешивать для использования.

Что касается защитной группы  $\text{P}^1$  для концевой аминогруппы соединения (6), может быть использована защитная группа для аминогруппы, которая обычно используется для синтеза пептидов, например, трет-бутилоксикарбонильная группа, 9-флуоренилметилоксикарбонильная группа и может быть использована бензилоксикарбонильная группа. Примеры другой защитной группы для аминогруппы могут включать алканоильную группу, такую как ацетильная группа; алкоксикарбонильную группу, такую как метоксикарбонильная группа и этоксикарбонильная группа; арилметоксикарбонильную группу, такую как параметоксикарбонильная группа и пара (или орто) нитробензилоксикарбонильная группа; арилметильную группу, такую как бензильная группа и трифенилметильная группа; ароильную группу, такую как бензоильная группа; и арилсульфонильную группу, такую как 2,4-динитробензолсульфонильная группа и ортонитробензолсульфонильная группа. Защитная группа  $\text{P}^1$  может быть выбрана в зависимости, например, от свойств соединения, имеющего защищаемую аминогруппу.

Сняв защитную группу  $\text{P}^1$  для концевой аминогруппы полученного соединения (6), можно получить соединение (7). Для этого снятия защиты реагенты и условия могут быть выбраны в зависимости от защитной группы.

Соединение (9) может быть получено дериватизацией пептидной карбоновой кислоты (8), *N*-конец которой защищен  $\text{P}^2$ , в активный сложный эфир, смешанный ангидрид кислоты или подобное, и его взаимодействием с полученным соединением (7). Условия реакции, реагенты, основание и инертный растворитель, используемые для образования пептидной связи между пептидной карбоновой кислотой (8) и соединением (7), могут быть подходящим образом выбраны и использованы из тех, которые описаны для синтеза соединения (6). Защитная группа  $\text{P}^2$  может быть подходящим образом выбрана и использована из тех, которые описаны для защитной группы в соединении (6), и выбор может быть сделан на основе, например, свойств соединения, имеющего аминогруппу, предназначенного для защиты. Поскольку его обычно используют для синтеза пептидов, путем последовательного повторения реакции и снятия защиты с аминокислоты или пептида, составляющего карбоновую кислоту пептида (8) для удлинения, можно также получить соединение (9).

Удалением защитной группы  $\text{P}^2$  для аминогруппы соединения (9) может быть получено соединение (10). Для этого снятия защиты, реагенты и условия могут быть выбраны в зависимости от защитной группы.

Можно получить соединение (2) путем дериватизации карбоновой кислоты (11) до активного сложного эфира, смешанного ангидрида кислоты, галогенангидрида или подобного, и его взаимодействия с полученным соединением (10). Условия реакции, реагенты, основание и инертный растворитель, используемые для образования пептидной связи между карбоновой кислотой (11) и соединением (10), могут быть подходящим образом выбраны и использованы из тех, которые описаны для синтеза соединения (6).

Соединение (9) также можно получить, например, следующим способом.

Соединение (13) может быть получено дериватизацией пептидной карбоновой кислоты (8), *N*-конец которой защищен  $\text{P}^2$ , в активный сложный эфир, смешанный ангидрид кислоты или подобное, и его взаимодействием в присутствии основания с аминосоединением (12) с карбоксильной группой, защищенной  $\text{P}^3$ . Условия реакции, реагенты, основание и инертный растворитель, используемые для образования пеп-

тидной связи между пептидной карбоновой кислотой (8) и соединением (12), могут быть подходящим образом выбраны и использованы из тех, которые описаны для синтеза соединения (6).

Защитная группа  $P^2$  для аминокруппы соединения (13) может быть защищена защитной группой, которую обычно используют.

В частности, примеры защитной группы для гидроксильной группы включают алкоксиметильную группу, такую как метоксиметильная группа; арилметильную группу, такую как бензильная группа, 4-метоксибензильная группа и трифенилметильная группа; алканоильную группу, такую как ацетильная группа; ароильную группу, такую как бензоильная группа; и силильную группу, такую как трет-бутилдифенилсилильная группа. Карбоксильная группа может быть защищена, например, в виде сложного эфира, алкильной группой, такой как метильная группа, этильная группа и трет-бутильная группа, аллильной группой или арилметильной группой, такой как бензильная группа. Примеры защитной группы для аминокруппы включают, например, алкилоксикарбонильную группу, такую как трет-бутилоксикарбонильная группа, метоксикарбонильная группа и этоксикарбонильная группа; аллилоксикарбонильную группу или арилметоксикарбонильную группу, такую как 9-флуоренилметилоксикарбонильная группа, бензилоксикарбонильная группа, параметоксибензилоксикарбонильная группа и пара (или орто) нитробензилоксикарбонильная группа; алканоильную группу, такую как ацетильная группа; арилметильную группу, такую как бензильная группа и трифенилметильная группа; ароильную группу, такую как бензоильная группа; и арилсульфонильную группу, такую как 2,4-динитробензолсульфонильная группа или ортонитробензолсульфонильная группа.

Что касается защитной группы  $P^3$  для карбоксильной группы, можно использовать защитную группу, обычно используемую в качестве защитной группы для карбоксильной группы в органической синтетической химии, в частности, при синтезе пептидов. Конкретные примеры включают сложные эфиры с алкильной группой, такой как метильная группа, этильная группа или трет-бутиловый, аллиловый сложные эфиры и бензиловые эфиры, и защитная группа может быть подходящим образом выбрана из описанных выше защитных групп. В таком случае, предпочтительно, чтобы защитная группа для аминокруппы и защитная группа для карбоксильной группы могли быть такими, которые предпочтительно удаляют другим способом или в других условиях. Например, типовой пример включает комбинацию, в которой  $P^2$  является трет-бутилоксикарбонильной группой, и  $P^3$  является бензильной группой. Защитные группы могут быть выбраны из вышеупомянутых групп в зависимости, например, от свойств соединения, имеющего аминокруппу и карбоксильную группу, которые необходимо защитить. Для удаления защитных групп реагенты и условия могут быть выбраны в зависимости от защитной группы.

Снятием защитной группы  $P^3$  для карбоксильной группы полученного соединения (13), можно получить соединение (14). Для этого снятия защиты реагенты и условия выбираются в зависимости от защитной группы.

Соединение (9) может быть получено дериватизацией полученного соединения (14) в активный сложный эфир, смешанный ангидрид кислоты, галогенангидрид или подобное, и взаимодействием с соединением (4) в присутствии основания. Для реакции также могут использоваться реакционные реагенты и условия, которые обычно используются для синтеза пептидов, и условия реакции, реагенты, основание и инертный растворитель, используемые для реакции, могут быть подходящим образом выбраны из тех, которые описаны для синтеза соединения (6).

Соединение (2) также можно получить, например, следующим способом.

Удалением защитной группы  $P^2$  для аминокруппы соединения (13), может быть получено соединение (15). Для этого снятия защиты реагенты и условия могут быть выбраны в зависимости от защитной группы.

Соединение (16) может быть получено путем дериватизации производного карбоновой кислоты (11) до активного сложного эфира, смешанного ангидрида кислоты, галогенангидрида кислоты или подобного, и его взаимодействия с соединением (15), полученным в присутствии основания. Условия реакции, реагенты, основание и инертный растворитель, используемые для образования амидной связи между пептидной карбоновой кислотой (11) и соединением (15), могут быть подходящим образом выбраны из тех, которые описаны для синтеза соединения (6).

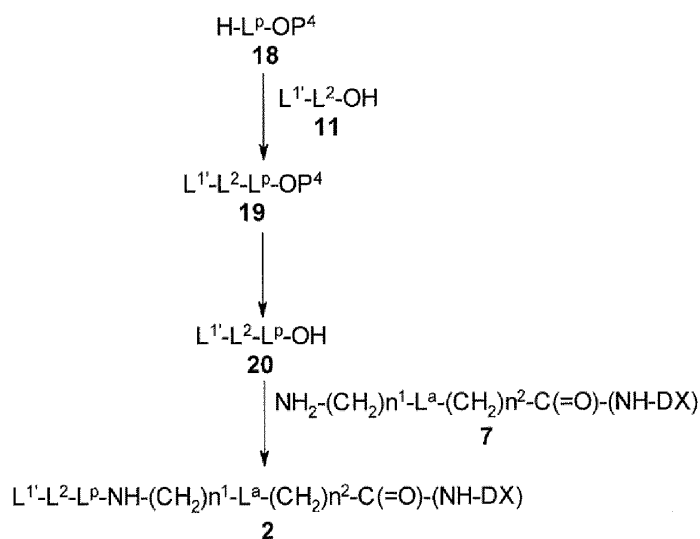
Удалением защитной группы для карбоксильной группы полученного соединения (16), можно получить соединение (17). Это снятие защиты можно проводить аналогично снятию защиты с карбоксильной группы для получения соединения (14).

Соединение (2) может быть получено дериватизацией соединения (17) в активный сложный эфир, смешанный ангидрид кислоты, галогенангидрид или подобное, и его взаимодействием с соединением (4) в присутствии основания. Для реакции также могут использоваться реакционные реагенты и условия, которые обычно используют для синтеза пептидов, и условия реакции, реагенты, основание и инертный растворитель, используемые для реакции, могут быть подходящим образом выбраны из тех, которые описаны для синтеза соединения (6).

Способ получения 3.

Соединение, представленное формулой (2) промежуточного соединения, также можно получить следующим способом.

## Формула 11



В формуле,  $L^1$  соответствует  $L^1$ , имеющему структуру, в которой конец превращен в малеимидильную группу, и  $P^4$  является защитной группой.

Соединение (19) может быть получено дериватизацией соединения (11) до активного сложного эфира, смешанного ангидрида кислоты или подобного, и его взаимодействием в присутствии основания с пептидной карбоновой кислотой (18), имеющей С-конец, защищенный  $P^4$ . Условия реакции, реагенты, основание и инертный растворитель, используемые для образования пептидной связи между пептидной карбоновой кислотой (18) и соединением (11), могут быть подходящим образом выбраны из тех, которые описаны для синтеза соединения (6). Защитная группа  $P^4$  для карбоксильной группы соединения (18) может быть подходящим образом выбрана из защитной группы, описанной выше.

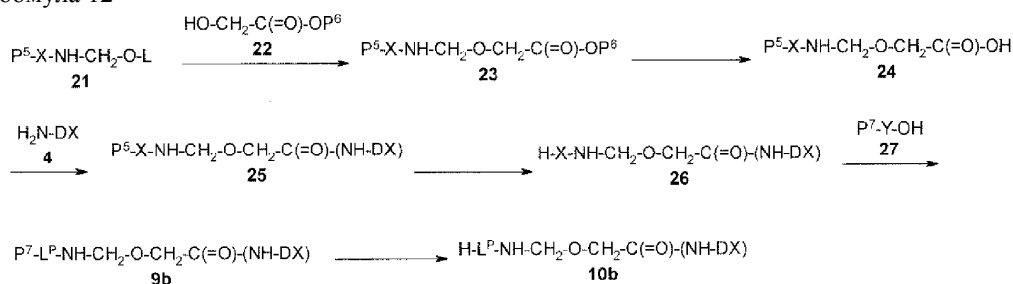
Удалением защитной группы для карбоксильной группы полученного соединения (19), можно получить соединение (20). Это снятие защиты может быть выполнено аналогично снятию защиты с карбоксильной группы для получения соединения (14).

Соединение (2) может быть получено дериватизацией полученного соединения (20) в активный сложный эфир, смешанный ангидрид кислоты или подобное, и его взаимодействием с соединением (7). Для реакции также могут использоваться реакционные реагенты и условия, которые обычно используют для синтеза пептидов, и условия реакции, реагенты, основание и инертный растворитель, используемые для реакции, могут быть подходящим образом выбраны из тех, которые описаны для синтеза соединения (6).

## Способ производства 4.

Ниже подробно описан способ получения соединения (10b), имеющего  $n^1=1$ ,  $L^a=O$ , в промежуточном продукте (10), описанном в способе получения 2. Соединение, представленное формулой (10b), его соль или сольват, можно получить, например, в соответствии со следующим способом.

## Формула 12



В формуле  $L^{\text{P}}$  такой, как определено выше,  $L$  является ацильной группой, которая является алканольной группой, такой как ацетильная группа, или группа сплава, такая как бензоильная группа, атом водорода и подобные,  $X$  и  $Y$  каждый является олигопептидом, состоящим из 1-3 аминокислот,  $P^5$  и  $P^7$  каждый является защитной группой для аминогруппы, и  $P^6$  является защитной группой для карбоксильной группы.

Соединение, представленное формулой (21), может быть получено с использованием или применением способа, описанного в выложенном патенте Японии № 2002-60351 или в литературе (J. Org. Chem., Vol. 51, page 3196, 1986), и, при необходимости, удалением защитных групп или модификацией функциональных групп. Альтернативно, его также можно получить обработкой аминокислоты с защищенной концевой аминогруппой или амида кислоты олигопептида защищенной аминогруппой с альдегидом или кетоном.

Взаимодействием соединения (21) с соединением (22), имеющим гидроксильную группу, при температуре в диапазоне от температурных условий охлаждения до комнатной температуры, в инертном растворителе, в присутствии кислоты или основания, может быть получено соединение (23).

Примеры кислоты, которую можно использовать в настоящем документе, могут включать неорганическую кислоту, такую как фтористоводородная кислота, хлористоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и борная кислота; органическую кислоту, такую как уксусная кислота, лимонная кислота, паратолуолсульфоновая кислота и метансульфоновая кислота; и кислоту Льюиса, такую как тетрафторборат, хлорид цинка, хлорид олова, хлорид алюминия и хлорид железа. Среди них предпочтительны сульфоновые кислоты, особенно паратолуолсульфоновая кислота. Что касается основания, любое из вышеупомянутых оснований может быть подходящим образом выбрано и использовано. Их предпочтительные примеры включают алкоксид щелочного металла, такой как трет-бутоксид калия; гидроксид щелочного металла, такой как гидроксид натрия и гидроксид калия; гидрид щелочного металла, такой как гидрид натрия и гидрид калия; металлоорганическое основание, представленное диалкиламинолитием, такое как диизопропиламид лития; и металлоорганическое основание бисилиламина, такое как бис(триметилсилил)амид лития. Примеры растворителя, используемого для реакции, включают эфирный растворитель, такой как тетрагидрофуран и 1,4-диоксан; и ароматический углеводородный растворитель, такой как бензол и толуол. Эти растворители могут быть получены в виде смеси с водой. Кроме того, защитная группа для аминогруппы, представленная  $P^5$ , особо не ограничивается, если это группа, обычно используемая для защиты аминогруппы. Типовые примеры включают защитные группы для аминогруппы, которые описаны в способе получения 2. Однако в настоящей реакции может иметь место случай, когда защитная группа для аминогруппы, представленная  $P^5$ , отщепляется. В таком случае необходимо провести реакцию с подходящим реагентом для защиты аминогруппы, поскольку может потребоваться повторное введение защитной группы.

Соединение (24) может быть получено удалением защитной группы  $P^6$  соединения (23). В настоящем документе, типовые примеры защитной группы для карбоксильной группы, представленной  $P^6$ , описаны в способе получения 2, и подходящая группа может быть выбрана из них. В соединении (23) желательно, чтобы защитная группа  $P^5$  для аминогруппы и защитная группа  $P^6$  для карбоксильной группы были защитными группами, которые могут быть удалены другим способом или в других условиях.

Например, типовой пример включает комбинацию, в которой  $P^5$  является 9-флуоренилметилоксикарбонильной группой, и  $P^6$  является бензильной группой. Защитные группы могут быть выбраны в зависимости, например, от свойств соединения, имеющего аминогруппу и карбоксильную группу, которые необходимо защитить. Для удаления защитных групп реагенты и условия выбирают в зависимости от защитной группы.

Соединение (26) можно получить путем дериватизации карбоновой кислоты (24) до активного сложного эфира, смешанного ангидрида кислоты, галогенангидрида и подобного, и его взаимодействия с соединением (4) или его фармакологически приемлемой солью с получением соединения (25) с последующим удалением защитной группы  $P^5$  полученного соединения (25). Для реакции между соединением (4) и карбоновой кислотой (24) и реакции удаления защитной группы  $P^6$  можно использовать те же реагенты и условия реакции, что описаны для способа получения 2.

Соединение (10b) может быть получено взаимодействием соединения (26) с аминокислотой, имеющей защищенную концевую аминогруппу, или олигопептидом (27), имеющим защищенную аминогруппу, с получением соединения (9b) и удалением защитной группы  $P^7$  полученного соединения (9b). Защитная группа для аминогруппы, представленная  $P^7$ , особо не ограничена, если ее обычно используют для защиты аминогруппы. Типовые примеры включают защитные группы для аминогруппы, которые описаны в способе получения 2. Для удаления защитной группы реагенты и условия выбирают в зависимости от защитной группы. Для реакции между соединением (26) и соединением (27) могут использоваться реакционные реагенты и условия, которые обычно используют для синтеза пептидов. Соединение (10b), полученное указанным выше способом, может быть дериватизировано до соединения (1) по настоящему изобретению согласно способу, описанному выше.

Конъюгат анти-TR0P2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, когда его оставляют на воздухе или перекристаллизовывают, например, для очистки, может поглощать влагу, чтобы иметь адсорбционную воду, или превращаться в гидрат, и такое соединение и соль, содержащая воду также включены в настоящее изобретение.

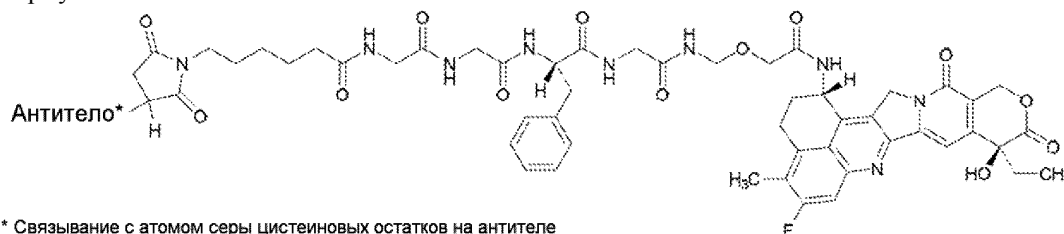
Соединение, меченное различными радиоактивными или не радиоактивными изотопами, также включено в настоящее изобретение. Один или несколько атомов, составляющих конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, могут содержать атомный изотоп в не природном соотношении. Примеры атомарного изотопа включают дейтерий ( $^2\text{H}$ ), тритий ( $^3\text{H}$ ), йод-125 ( $^{125}\text{I}$ ) и углерод-14 ( $^{14}\text{C}$ ). Кроме того, соединение по настоящему изобретению может быть мечено радиоактивным изотопом, таким как тритий ( $^3\text{H}$ ), йод-125 ( $^{125}\text{I}$ ), углерод-14 ( $^{14}\text{C}$ ), медь-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), цирконий-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ), йод-124 ( $^{124}\text{I}$ ), фтор-18 ( $^{18}\text{F}$ ), индий-111 ( $^{111}\text{In}$ ), углерод-11 ( $^{11}\text{C}$ ) и йод-131 ( $^{131}\text{I}$ ). Соединение, меченное радиоактивным изотопом, можно использовать в качестве терапевтического или профилактического средства, реагента для исследований, такого как реагент для анализа, и средства для диагностики, такого как сред-

ство диагностической визуализации *in vivo*. Не относясь к радиоактивности, любой изотопный вариант конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению входит в объем настоящего изобретения.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC).

В настоящем описании предложен конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), таргетирующий TROP2, содержащий анти-TROP2 антитело и противораковое соединение, такое как ингибитор топоизомеразы I (Dxd). См. фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления, ADC, таргетирующий TROP2, может содержать формулу 13, как показано ниже:

Формула 13



\* Связывание с атомом серы цистеиновых остатков на антителе

В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь ADC может содержать:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTAGMQWVRQAPGGLEWMGWINTHSG  
VPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSFGSSYWFVDVWGQG  
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF  
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP  
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ  
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLL  
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 45).

В некоторых вариантах осуществления, легкая цепь ADC может содержать:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRYTGVP  
SRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTL  
TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 46).

Конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению проявляет цитотоксическую активность против раковых клеток, и, таким образом, его можно использовать в качестве лекарственного средства, в частности, в качестве терапевтического агента и/или профилактического агента при раке.

То есть, конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению можно избирательно использовать в качестве лекарственного средства для химиотерапии, которая является основным способом лечения рака, и, как результат, может задерживать развитие раковых клеток, подавлять их рост, и дополнительно убивать раковые клетки. Это может позволить пациентам с раком избавиться от симптомов, вызванных раком, или добиться улучшения QOL пациентов с раком, а также достичь терапевтического эффекта, поддерживая жизнь пациентов с раком. Даже если конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению не приводит к уничтожению раковых клеток, он может обеспечить более высокое качество жизни пациентов с раком при одновременном достижении их более длительного выживания за счет ингибирования или контроля роста раковых клеток.

В такой лекарственной терапии его можно использовать как отдельное лекарственное средство, а также как лекарственное средство в комбинации с дополнительной терапией в адъювантной терапии, и оно может быть скомбинировано с хирургической операцией, радиотерапией, гормональной терапией и подобными. Кроме того, его также можно использовать в качестве лекарственного средства в неадъювантной терапии.

В дополнение к терапевтическому применению, как описано выше, эффект подавления роста мельчайших метастатических раковых клеток и дальнейшего их уничтожения путем связывания с этими раковыми клетками также можно ожидать благодаря свойству связывания антитела с антигеном. В частности, когда экспрессия TROP2 подтверждается в первичных раковых клетках, можно ожидать ингибирования метастазирования рака или профилактического эффекта путем введения конъюгата анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению. Например, можно ожидать эффект ингибирования и уничтожения раковых клеток в жидкости организма в ходе метастазирования, или эффект,

например, ингибирования и уничтожения мельчайших раковых клеток сразу после имплантации в любую ткань. Кроме того, можно ожидать ингибирования метастазирования рака или профилактического эффекта, особенно после хирургического удаления рака. Соответственно, можно ожидать эффекта ингибирования метастазирования рака.

Можно ожидать, что конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению будет оказывать терапевтический эффект при введении пациентам в качестве системной терапии и, кроме того, при местном введении в раковые ткани.

Примеры типа рака, для которого применяют конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, включают рак легких, рак почки, уротелиальный рак, колоректальный рак, рак простаты, мультиформную глиобластому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак груди, меланому, рак печени, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак шейки матки, рак головы и шеи или рак пищевода, однако они не ограничиваются вышеперечисленными, до тех пор пока раковая клетка экспрессирует, в раковой клетке в качестве объекта лечения, белок, который может распознавать антитело в конъюгате антитело-лекарственное средство.

Конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению можно предпочтительно вводить млекопитающему, но более предпочтительно, его вводят человеку.

Фармацевтические композиции и способы введения.

Вещества, используемые в фармацевтической композиции, содержащей конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, могут быть подходящим образом выбраны и применены из добавок к составам или подобных, которые обычно используют в данной области, с учетом дозировки или концентрации для введения.

Конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, содержащей, по меньшей мере, один фармацевтически подходящий ингредиент. Например, фармацевтическая композиция обычно может содержать, по меньшей мере, один фармацевтический носитель (например, стерилизованную жидкость). В некоторых вариантах осуществления, жидкость включает, например, воду и масло (нефтяное масло и масло животного происхождения, растительного происхождения или синтетического происхождения). Масло может быть, например, арахисовым маслом, соевым маслом, минеральным маслом или кунжутным маслом. Вода является более типовым носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Солевой раствор, водный раствор декстрозы и водный раствор глицерина также могут использоваться в качестве жидкого носителя, в частности, для инъекционного раствора. Подходящий фармацевтический носитель известен в данной области техники. Если желательно, указанная выше композиция может также содержать следовые количества увлажняющего агента, эмульгирующего агента или pH буферного агента. Примеры подходящего фармацевтического носителя раскрыты в "Remington's Pharmaceutical Sciences" E. W. Martin. Составы соответствуют способу введения.

Фармакологически приемлемые носители для различных дозированных форм известны в данной области техники. Например, известны эксципиенты, лубриканты, связующие и разрыхлители для твердых препаратов; известны растворители, солубилизирующие агенты, суспендирующие агенты, агенты, регулирующие изотоничность, буферы и смягчающие агенты для жидких препаратов. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции включают один или несколько дополнительных компонентов, таких как один или несколько консервантов, антиоксидантов, стабилизирующих агентов и подобных.

Кроме того, описанные фармацевтические композиции могут быть составлены в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и подобные) и их подходящие смеси. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. В некоторых вариантах осуществления, будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание композиций для инъекций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Обычно дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его раствора, предварительно стерилизованного фильтрованием.



Известны различные системы доставки, и их можно использовать для введения конъюгата анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению. Примеры пути введения включают внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный и подкожный пути, но не ограничиваются ими. Введение может осуществляться, например, путем инъекции или болюсной инъекции. Согласно конкретному предпочтительному варианту осуществления, введение конъюгата антитело-лекарственное средство осуществляют путем инъекции. Парентеральное введение является предпочтительным путем введения.

Согласно типовому варианту осуществления, фармацевтическая композиция назначается в виде фармацевтической композиции, подходящей для внутривенного введения человеку, в соответствии с общепринятыми процедурами. Композицией для внутривенного введения обычно является раствор в стерильном и изотоническом водном буферном растворе. При необходимости, препарат может содержать солибилизирующий агент и местные анестетики для облегчения боли в месте инъекции (например, лигнокаин). Как правило, указанный выше ингредиент представлен индивидуально в виде любого из лиофилизированного порошка или безводного концентрата, содержащегося в контейнере, который получают путем запечатывания в ампуле или саше, содержащем определенное количество активного агента, или в виде смеси в стандартной дозированной форме. Когда лекарственное средство имеет форму для введения инъекции, его можно вводить из бутылки для инъекций, содержащей воду или солевой раствор стерильной фармацевтической степени чистоты. Когда лекарство вводят путем инъекции, может быть представлена ампула стерильной воды или солевого раствора для инъекций, так что вышеупомянутые ингредиенты смешивают друг с другом перед введением.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть фармацевтической композицией, содержащей только конъюгат анти-TROP2-антитело-лекарственное средство по настоящей заявке, или фармацевтической композицией, содержащей конъюгат анти-TROP2-антитело-лекарственное средство и, по меньшей мере, один агент для лечения рака, отличный от конъюгата. Конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению можно вводить с другим агентом для лечения рака, одновременно или последовательно. Соответственно может быть усилен противораковый эффект. Другой противораковый агент, используемый для этой цели, можно вводить индивиду одновременно, отдельно или после конъюгата антитело-лекарственное средство, и его можно вводить, изменяя интервал введения для каждого из них. Примеры агента для лечения рака включают абраксан, паклитаксел, цисплатин, гемцитабин, иринотекан (СРТ-11), паклитаксел, пеметрексед, сорафениб, винорелбин, лекарственные средства, описанные в международной публикации № WO 2003/038043, аналоги LH-RH (лейпрорелин, гoserелин или подобные), эстрамустина фосфат, антагонист эстрогена (тамоксифен, ралоксифен или подобные) и ингибитор ароматазы (анастрозол, летрозол, экземестан или подобные), но не ограничиваются ими, пока они являются лекарственным средством, обладающим противоопухолевым действием.

Фармацевтическая композиция может быть составлена в виде лиофилизированного состава или жидкого состава в виде состава, имеющего желаемый состав и требуемую чистоту. При составлении в виде состава для лиофилизации, это может быть состав, содержащий подходящие добавки к составу, которые используют в данной области техники. Также для жидкого состава он может быть составлен в виде жидкого состава, содержащего различные добавки к составу, которые используют в данной области техники.

Состав и концентрация фармацевтической композиции могут варьироваться в зависимости от способа введения. Однако, конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство, содержащийся в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, может проявлять фармацевтический эффект даже при небольшой дозировке, когда конъюгат антитело-лекарственное средство имеет более высокую аффинность к антигену, то есть, более высокую аффинность (=более низкое значение  $K_d$ ) в пересчете на константу диссоциации (то есть значение  $K_d$ ) для антигена. Таким образом, для определения дозировки конъюгата антитело-лекарственное средство, дозировка может быть определена с учетом ситуации, связанной с аффинностью между конъюгатом антитело-лекарственное средство и антигеном. Когда конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению вводят человеку, например, приблизительно от 0,001 до 100 мг/кг можно вводить один раз или вводить несколько раз с интервалом один раз в течение от 1 до 180 дней.

Раки, экспрессирующие TROP2.

TROP2 высоко экспрессируется при эпителиальном раке, и его экспрессия связана с плохой выживаемостью. Примеры рака, экспрессирующего TROP2, включают, но не ограничиваются ими, рак легких, рак почки, уротелиальный рак, колоректальный рак, рак простаты, мультиформную глиобластому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак груди, меланому, рак печени, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак шейки матки, рак головы и шеи и рак пищевода. Любой из этих видов рака можно лечить с помощью описанных ADC и схем дозирования ADC. Однако следует понимать, что до тех пор, пока раковая клетка экспрессирует TROP2, ее можно лечить в соответствии с описанными способами, даже если она не попадает в перечисленные выше категории рака.

Немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) является типом рака легкого, который особенно подходит

для лечения с использованием описанных ADC и схем дозирования. Например, в примерах 5-7 подробно описаны клинические исследования фазы I, в которых описанный ADC вводят субъектам с NSCLC.

Описанный ADC, таргетирующий TROP2, можно использовать для лечения любой из вышеупомянутых опухолей, экспрессирующих TROP2.

Способы лечения и использование.

В настоящем описании представлены способы лечения рака, включающие введение конъюгата анти-TROP2 антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем документе. В настоящем документе также представлены любые описанные анти-TROP ADC для использования при лечении рака.

В некоторых вариантах осуществления, раком является рак, экспрессирующий TROP2. Раки, экспрессирующие TROP2, могут включать, но не ограничиваются ими, рак легких (например, немелкоклеточный рак легких или NSCLC), рак почки, уротелиальный рак, колоректальный рак, рак простаты, мультиформную глиобластому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак груди, меланому, рак печени, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак шейки матки, рак головы и шеи и рак пищевода.

Для целей настоящего описания, термин "рак, сверхэкспрессирующий TROP2" особо не ограничен до тех пор, пока он распознается специалистами в данной области техники как рак, сверхэкспрессирующий TROP2. Предпочтительные примеры рака, сверхэкспрессирующего TROP2, могут включать рак, получивший высокий балл за экспрессию TROP2 в иммуногистохимическом способе (ИХ) или способе гибридизации *in situ* (ISH). Способ гибридизации *in situ* по настоящему изобретению включает способ флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и способ двухцветной гибридизации *in situ* (DISH).

Способ оценки степени экспрессии TROP2 иммуногистохимическим способом, или способ определения положительности или отрицательности экспрессии TROP2 способом гибридизации *in situ* особо не ограничивается, если он распознается специалистами в данной области техники.

ADC и способы лечения и применения настоящего изобретения могут предпочтительно использоваться для лечения неоперабельного или рецидивирующего рака.

В некоторых вариантах осуществления, ADC и способы лечения и применения настоящего изобретения также могут быть использованы в качестве фармацевтической композиции для лечения рака, содержащей конъюгат антитело-лекарственное средство, используемый в настоящем изобретении, его соль или его гидрат в качестве активного компонента и фармацевтически приемлемого компонента состава.

В некоторых вариантах осуществления, ADC и способы лечения и применения настоящего изобретения демонстрируют превосходную противоопухолевую активность против рака, который проявляет резистентность к существующему противораковому лекарственному средству (т.е. резистентного рака), в частности рака, который приобрел резистентность к существующему противораковому лекарственному средству (т.е. вторично резистентному раку). Таким образом, ADC для лечения по настоящему изобретению оказывает заметный противоопухолевый эффект при применении к группе пациентов с раком, имеющим резистентность к существующему противораковому лекарственному средству (пациенты, имеющие историю лечения существующим противораковым препаратом) среди онкологических пациентов. В частности, рак, поддаваемый лечению, может быть резистентным или рефрактерным к лечению ингибитором EGFR (т.е., gefитинибом, эрлотинибом, осимертинибом, афатинибом), лечению ингибитором ALK (т.е., алектинибом, кризотинибом, церитинибом), химиотерапевтическими препаратами на основе платины (т.е., цисплатином, карбоплатином) и/или лечением ингибиторами контрольных точек (т.е., ниволумабом, пембролизумабом, атезолизумабом, авелумабом, ипилимумабом, дурвалумабом, тислелизумабом, синтилимабом, цемиплимабом).

ADC для лечения по настоящему изобретению можно вводить вместо существующих противораковых лекарственных средств или в комбинации с этими существующими противораковыми лекарственными средствами пациенту с раком, чтобы тем самым продемонстрировать высокий терапевтический эффект, например, в отношении рака, который приобрел резистентность к этим существующим противораковым лекарственным средством.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления описанных способов и применений, рак, поддаваемый лечению, может быть резистентной формой рака легких (например, немелкоклеточного рака легкого или NSCLC), рака почки, уротелиального рака, колоректального рака, рака простаты, мультиформной глиобластомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака груди, меланомы, рака печени, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака шейки матки, рака головы и шеи и рака пищевода.

ADC и способы или применения для лечения по настоящему изобретению могут задерживать развитие раковых клеток, ингибировать их рост и дополнительно убивать раковые клетки. Эти эффекты могут позволить пациентам с раком избавиться от симптомов, вызванных раком, или достичь улучшения качества жизни (QOL) пациентов с раком и достичь терапевтического эффекта, поддерживая жизнь пациентов с раком. Даже если конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению не приводит к уничтожению раковых клеток, он может обеспечить более высокое качество жизни пациентов с раком при достижении более длительного выживания за счет ингибирования или контроля роста раковых клеток.

В некоторых вариантах осуществления описанных способов и применений, ADC можно использовать в качестве лекарственного средства отдельно, или его можно использовать в качестве лекарственно-

го средства в сочетании с дополнительной терапией в адъювантной терапии и можно комбинировать с хирургической операцией, радиотерапией, гормональной терапией или подобными. Кроме того, его также можно использовать в качестве лекарственного средства в неoadъювантной терапии. В некоторых вариантах осуществления, ADC можно комбинировать, например, с противораковым агентом, включая, помимо прочего, абраксан, паклитаксел, цисплатин, карбоплатин, гемцитабин, иринотекан (СРТ-11), пемтрексед, сорафениб, винорелбин, лекарственные средства, описанные в Международной публикации № WO 2003/038043, аналоги LH-RH (лейпрорелин, гозерелин или подобные), эстрамустина фосфат, антагонист эстрогена (тамоксифен, ралоксифен или подобные), ингибитор ароматазы (анастрозол, летрозол, экземестан или подобные), лечение ингибиторами EGFR (гефитинибом, эрлотинибом, осимертинибом, афлатинибом), лечение ингибиторами ALK (алектинином, кризотинибом, церитинибом) и/или лечение ингибиторами контрольных точек (ниволумабом, пембролизумабом, атезолизумабом, авелумабом, ипилимумабом, дурвалумабом, тислелизумабом, синтилимабом, цемиплимабом).

В дополнение к терапевтическим способам и применениям, описанным выше, можно также ожидать профилактический эффект подавления роста небольших метастатических раковых клеток и их дальнейшего уничтожения. В частности, когда экспрессия TROP2 подтверждается в первичных раковых клетках, можно ожидать ингибирование метастазирования рака или профилактический эффект при введении конъюгата анти-TROP2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению. Например, можно ожидать эффект ингибирования и уничтожения раковых клеток в жидкости организма в ходе метастазирования, или эффект, например, ингибирование и уничтожение малых раковых клеток сразу после имплантации в любую ткань. Соответственно, можно ожидать ингибирование метастазирования рака или профилактический эффект, в частности, после хирургического удаления рака.

В некоторых вариантах осуществления способов и применений, субъекту с раком (например, раком, экспрессирующим TROP2) можно вводить от примерно 0,1 до примерно 15 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 12 мг/кг, от примерно 1,0 до примерно 10 мг/кг или от примерно 4 до примерно 8 мг/кг. Другими словами, в некоторых вариантах осуществления, доза ADC, вводимая субъекту, может составлять примерно 0,1, примерно 0,2, примерно 0,3, примерно 0,4, примерно 0,5, примерно 0,6, примерно 0,7, примерно 0,8, примерно 0,9, примерно 1,0, примерно 1,25, примерно 1,5, примерно 1,75, примерно 2,0, примерно 2,25, примерно 2,5, примерно 2,75, примерно 3,0, примерно 3,25, примерно 3,5, примерно 3,75, примерно 4,0, примерно 4,25, примерно 4,5, примерно 4,75, примерно 5,0, примерно 5,25, примерно 5,5, примерно 5,75, примерно 6,0, примерно 6,25, примерно 6,5, примерно 6,75, примерно 7,0, примерно 7,25, примерно 7,5, примерно 7,75, примерно 8,0, примерно 8,25, примерно 8,5, примерно 8,75, примерно 9,0, примерно 9,25, примерно 9,5, примерно 9,75, примерно 10,0, примерно 10,25, примерно 10,5, примерно 10,75, примерно 11,0, примерно 11,25, примерно 11,5, примерно 11,75 или примерно 12 мг/кг или более. В некоторых вариантах осуществления, доза ADC, вводимая субъекту, может составлять 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,25, 3,5, 3,75, 4,0, 4,25, 4,5, 4,75, 5,0, 5,25, 5,5, 5,75, 6,0, 6,25, 6,5, 6,75, 7,0, 7,25, 7,5, 7,75, 8,0, 8,25, 8,5, 8,75, 9,0, 9,25, 9,5, 9,75, 10,0, 10,25, 10,5, 10,75, 11,0, 11,25, 11,5, 11,75 или 12 мг/кг или более. В некоторых вариантах осуществления, доза может составлять от примерно 2 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 2 мг/кг до примерно 8 мг/кг, от примерно 4 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 4 мг/кг до от примерно 8 мг/кг, от примерно 6 мг/кг до примерно 10 мг/кг или от примерно 6 мг/кг до примерно 8 мг/кг. В предпочтительных вариантах осуществления, доза может составлять 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг, но более предпочтительно, 4 мг/кг, 6 мг/кг или 8 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления способов и применений, анти-TROP2 ADC или его фармацевтическую композицию вводят субъекту с раком посредством парентерального введения. Предпочтительные парентеральные пути введения включают, но не ограничиваются ими, инъекции, такие как внутривенные, внутримышечные и подкожные инъекции. Можно ожидать, что конъюгат анти-TROP2 антитело-лекарственное средство, используемый в настоящем изобретении, будет оказывать терапевтический эффект при применении в качестве системной терапии для пациентов и, кроме того, путем местного нанесения на раковые ткани.

Время или схема приема могут быть один раз в 1 неделю (q1w), один раз в 2 недели (q2w), один раз в 3 недели (q3w), один раз в 4 недели (q4w), один раз в 5 недель (q5w), один раз в 6 недель (q6w), один раз в 7 недель (q7w), один раз в 8 недель (q8w), один раз в 9 недель (q9w) или один раз в 10 недель (q10w), но, предпочтительно, один раз в 3 или 4 недели.

Схемы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа, такого как регресс или ремиссия опухоли). Например, в некоторых вариантах осуществления, схема дозирования может составлять 2 мг/кг один раз каждые 3 недели (q3w), 4 мг/кг один раз каждые 3 недели (q3w), 6 мг/кг один раз каждые 3 недели (q3w), 8 мг/кг один раз каждые 3 недели (q3w), 2 мг/кг один раз каждые 4 недели (q4w), 4 мг/кг один раз каждые 4 недели (q4w), 6 мг/кг один раз каждые 4 недели (q4w) или 8 мг/кг один раз в 4 недели (каждые 4 недели). И в некоторых вариантах осуществления, можно вводить один болюс, тогда как в некоторых вариантах осуществления, можно вводить несколько разделенных доз с течением времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в зависимости от ситуации.

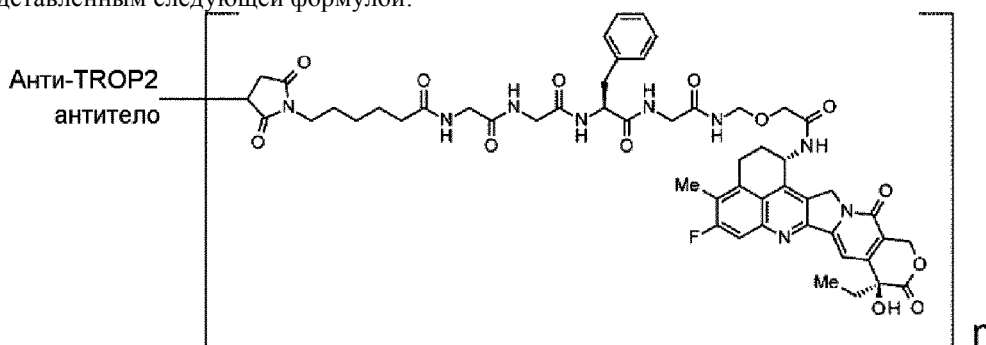
Кроме того, хотя субъектом способов и применений обычно является пациент с раком, возраст пациента не ограничен. Описанные способы и применения полезны для лечения рака, злокачественного заболевания или пролиферации раковых клеток с различными рецидивами и прогностическими исходами для всех возрастных групп и когорт. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, субъект может быть педиатрическим субъектом, тогда как в других вариантах осуществления, субъект может быть взрослым субъектом.

Следующие ниже примеры приведены для иллюстрации настоящего изобретения. Однако следует понимать, что изобретение не ограничивается конкретными условиями или деталями, описанными в этих примерах.

### Примеры

Пример 1. Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство.

В соответствии со способами получения, описанными в международной публикации № WO2015/098099 и международной публикации № WO2017/002776, анти-TROP2 антитело (например, антитело, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-451 в SEQ ID NO: 45 и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-214 в SEQ ID NO: 46), используют для получения конъюгата антитело-лекарственное средство (1) и конъюгата антитело-лекарственное средство (2) (далее именуемых "конъюгат антитело-лекарственное средство (1)" и "конъюгат антитело-лекарственное средство (2)"), в которых анти-TROP2 антитело связано через тиоэфирную связь с линкером лекарственного средства, представленным следующей формулой:



где  $n$  является средним отношением лекарственного средства к антителу (DAR) на одну молекулу антитела; и значение  $n$  конъюгата антитело-лекарственное средство (1) находится в диапазоне от 3,5 до 4,5; тогда как значение  $n$  конъюгата антитело-лекарственное средство (2) находится в диапазоне от 6,5 до 8,0.

Общие структуры и последовательности конъюгата антитело-лекарственное средство (1) и конъюгата антитело-лекарственное средство (2) представлены на фиг. 1 и 2.

Пример 2. Тест на противоопухолевый эффект конъюгатов антитело-лекарственные средство.

Для целей этого эксперимента, самок голых мышей BALB/c в возрасте 5-6 недель (Charles River Laboratories Japan) подвергают экспериментам. Клеточную линию аденокарциномы поджелудочной железы человека, клетки CFPAC-1, приобретенную в ATCC, суспендируют в солевом растворе и трансплантируют  $4 \times 10^6$  клеток в правую часть тела каждой из самок голых мышей. Через четырнадцать дней после трансплантации мышей объединяют в группы (день 0). В группах однократного введения (один раз в три недели), конъюгаты антитело-лекарственное средство (1) и (2) вводят в дозе 0,3 мг/кг или 1 мг/кг в день 0. В группах частого введения (один раз в неделю в течение трех недель), конъюгаты антитело-лекарственное средство (1) и (2) вводят в дозе 0,3 мг/кг в день 0, день 8 и день 14. Группу введения носителя определяют как контрольную группу. Подавление роста опухоли (TGI) на 22 день получают расчетным путем. Ни в одной из групп введения не было подтверждено особо заметных открытий, таких как потеря веса.

Измерения/вычислительное выражение: большую ось и малую ось опухолей измеряют электронным цифровым штангенциркулем (CD-15CX, Mitutoyo Corp.) два раза в неделю и рассчитывают объемы опухолей ( $\text{мм}^3$ ). Вычислительное выражение показано ниже:

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = 1/2 \times \text{по большой оси (мм)} \times [\text{малая ось (мм)}]^2$$

Подавление роста опухоли (TGI) рассчитывают согласно следующему вычислительному выражению:

$$\text{Ингибирование роста опухоли (\%)} = 100 \times (1 - T/C)$$

где  $T$  является средним объемом опухоли в группе мышей, которым вводят тестируемое вещество; и  $C$  является средним объемом опухоли контрольной группы мышей.

Каждый из конъюгатов антитело-лекарственное средство (1) и (2) разводят солевым раствором с ацетатным буфером (pH 5,5) (производства Nacalai Tesque Inc., далее именуемым "буфер ABS"). Раствор

для разведения (10 мл/кг) вводят через хвостовую вену.

Противоопухолевые эффекты конъюгатов антитело-лекарственное средство (1) и (2) показаны на фиг. 3. В конъюгате антитело-лекарственное средство (1) TGI группы однократного введения в дозе 0,3 мг/кг составляет 15%, и TGI группы однократного введения в дозе 1 мг/кг составляет 86%; тогда как TGI в группе частого введения в дозе (0,3 мг/кг) составляет 34%. В конъюгате антитело-лекарственное средство (2) TGI группы однократного введения в дозе 0,3 мг/кг составляет 43%, и TGI группы однократного введения в дозе 1 мг/кг составляет 94%; тогда как TGI в группе частого введения в дозе (0,3 мг/кг) составляет 80%.

Из приведенных выше результатов, в обоих случаях конъюгатов антитело-лекарственное средство (1) и (2), когда группу однократного введения в дозе 1 мг/кг сравнивают с группой частого введения в дозе 0,3 мг/кг, оба препарата обеспечивают в сумме почти эквивалентную дозу, TGI группы однократного введения выше, чем у группы частого введения. Исходя из этого, продемонстрировано, что способ однократного введения общей дозы в течение трех недель только один раз имеет более высокую эффективность, чем способ частого введения с повторением введения дозы в течение недели, три раза. По сравнению между конъюгатами антитело-лекарственное средство (1) и (2), TGI группы однократного введения конъюгата антитело-лекарственное средство (1) в дозе 1 мг/кг выше, чем TGI группы однократного введения конъюгата антитело-лекарственное средство (2) в дозе 0,3 мг/кг и ниже, чем TGI группы однократного введения конъюгата антитело-лекарственное средство (2) в дозе 1 мг/кг. На основании этого продемонстрировано, что разница в терапевтических дозах между конъюгатами антитело-лекарственное средство (1) и (2) находится в трехкратном диапазоне.

Пример 3. Оценка безопасности конъюгатов антитело-лекарственное средство.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (1) и (2), полученные в соответствии с примером 1, вводят отдельно перекрестно-реактивным видам, яванским макакам. Более конкретно, конъюгат антитело-лекарственное средство (1) вводят с интервалами один раз в три недели, всего три раза; тогда как конъюгат антитело-лекарственное средство (2) вводят с интервалом один раз в неделю, всего дважды. В случае конъюгата антитело-лекарственное средство (1), наблюдение продолжают вплоть до следующего дня после последнего введения. В случае конъюгата антитело-лекарственное средство (2), наблюдение продолжают до следующей недели после последнего введения. В результате, наивысшая нетяжелая токсическая доза (HNSTD) конъюгата антитело-лекарственное средство (2) составляет менее 10 мг/кг; тогда как HNSTD конъюгата антитело-лекарственное средство (1) составляет 30 мг/кг. Таким образом, было продемонстрировано, что конъюгат антитело-лекарственное средство (1) имеет лучшую безопасность, чем конъюгат антитело-лекарственное средство (2).

Пример 4. Оценка эффективной дозировки/дозы конъюгата антитело-лекарственное средство (1) у людей.

В дальнейшем "конъюгат антитело-лекарственное средство (1)" может также называться "DS-1062a".

Конъюгат антитело-лекарственное средство (1) (т.е. DS-1062a) вводят внутривенно один раз в дозе 0,2, 0,6, 2 или 6 мг/кг яванским макакам. После этого, на основе концентрации в плазме конъюгата антитело-лекарственное средство (1), рассчитывают фармакокинетические параметры с использованием модели мишень-опосредованного распределения препарата. Кроме того, оценивают изменение концентрации в плазме конъюгата антитело-лекарственное средство со временем во время повторного введения человеку. Конъюгат антитело-лекарственное средство (1) вводят путем повторения цикла дозирования, состоящего из 0,27, 0,54, 0,81, 1,6, 3,2 и 6,4 мг/кг один раз в три недели, три раза (q3w×3). Результаты показаны на фиг. 4. Изменение концентрации в плазме конъюгата антитело-лекарственное средство (1) со временем, оцененное у людей, сравнивают с концентрацией в плазме на 21 день на мышинной модели опухоли CFPAC-1. В результате, дозы, при которых концентрацию в плазме оценивают в момент введения человеку один раз в каждые три недели (q3w), превышающие минимальную концентрацию (группа введения 1 мг/кг, 0,312 мкг/мл), показывающую регрессию опухоли у мышей в половине и большей части интервала введения, составляют 0,27 и 0,81 мг/кг, соответственно. Исходя из этого, подсчитывают, что эффективная дозировка/доза конъюгата антитело-лекарственное средство (1) для людей составляет 0,27 мг/кг или более один раз в три недели.

Пример 5. Начальное клиническое исследование фазы 1.

Вступление.

DS-1062a является конъюгатом антитело-лекарственное средство, таргетирующим антиген клеточной поверхности трофобластной клетки 2 (TROP2), с новым ингибитором топоизомеразы I (производное экзатекана; DXd). DS-1062a связывается с TROP2 на поверхности клетки, интернализует и высвобождает DXd в цитоплазму после ферментативного процессинга, который ингибирует топоизомеразу I и приводит к апоптозу клеток-мишеней.

TROP2 высоко экспрессируется при эпителиальном раке, включая рак легких, и связан с плохой выживаемостью. В доклинических исследованиях, DS-1062a показал многообещающую противоопухолевую активность на моделях ксенотрансплантатов у мышей.

Цель.

Целью этого исследования является оценка безопасности и переносимости DS-1062a и определение максимально переносимой дозы (MTD) и рекомендуемой дозы для расширения (RDE) (см. идентификатор NCT03401385 на сайте [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)).

Дизайн и способы исследования.

Фаза 1 представляет собой многоцентровое открытое первое исследование многократных доз DS-1062a у человека, в которое вовлечены пациенты из США и Японии. Исследование включает как группу увеличения дозы, так и группу расширения дозы, как показано на фиг. 5. Группа увеличения дозы включает однократную внутривенную инфузию DS-1062a и 21-дневный период наблюдения дозозимитирующей токсичности (DLT) (цикл 1). Группа расширения дозы включает введение субъектам с NSCLC дозы DS-1062a при RDE.

Основным возражением группы повышения дозы является определение MTD для RDE и оценка безопасности и переносимости доз.

Основная цель группы расширения дозы заключается в подтверждении безопасности и переносимости DS-1062a при RDE.

Вторичные цели включают измерение фармакокинетических (ПК) свойств DS-1062a, общего антигена TROP2, компонентов лекарственного средства и противоопухолевой активности DS1062a. Исследовательские цели включают оценку биомаркеров, которые коррелируют с ответом на DS-1062a.

Критерии включения включают: пациенты в возрасте  $\geq 20$  лет (Япония) или  $\geq 18$  лет (США) с патологически подтвержденным метастатическим NSCLC без стандартного варианта лечения; общее состояние по Eastern Cooperative Oncology Group 0 или 1; измеримое заболевание на основе RECIST версии 1.1; ожидаемая продолжительность жизни  $\geq 3$  месяцев; и доступная опухолевая ткань для измерения недавних уровней TROP2 с помощью иммуногистохимии.

Критерии исключения включают: пациентов с множественными первичными злокачественными новообразованиями (за исключением адекватно резецированного не меланомного рака кожи, заболевания, леченного *in situ* или других солидных опухолей, леченных без признаков заболевания в течение  $\geq 3$  лет); или клинически значимое/подозреваемое заболевание легких.

Обследование пациентов включает эхокардиограмму или многоканальное сканирование, электрокардиограмму в 12 отведениях, АЕ, ПК, анти-человеческие антитела человека, биомаркеры и оценку опухоли во время заранее оговоренных посещений. Демографические и исходные характеристики пациентов, включенных в это первоначальное исследование фазы 1, показаны на фиг. 6.

Повышение дозы DS-1062a для определения MTD осуществляют с помощью модифицированного способа непрерывной переоценки с использованием модели байесовской логистической регрессии после повышения с использованием принципа контроля передозировки. Частота объективного ответа (ORR) суммирована с 95% доверительными интервалами (CI) с использованием способа Клоппера-Пирсона; выживаемость без прогрессирования (PFS)/общая выживаемость (OS) суммированы с использованием способа Каплана-Мейера. Конечные точки безопасности, ПК параметры DS-1062a, анти-TROP2 антитела, DXd и антитела против лекарственного средства в плазме суммированы с использованием описательной статистики.

Полученные результаты.

Тридцать девять пациентов включены в момент превращения сбора данных среди семи групп дозирования DS-1062a, а также демографические и исходные характеристики пациентов. Пациентов (N=39) подвергают медианным (диапазон) 3,0 (1-10) циклам лечения DS-1062a в течение медианной (диапазон) продолжительности 8,86 (3,0-31,1) недель.

Двум пациентам потребовалось прерывание дозы DS-1062a (одному в группе 4 мг/кг и одному в группе 8 мг/кг), и одному пациенту в группе 6,0 мг/кг потребовалось снижение дозы. В целом 23 (54,8%) пациента прекратили лечение DS-1062a. Первичной причиной прекращения приема была PD по RECIST у 13 пациентов (n=4 каждая [0,5 и 2,0 мг/кг]; n=3 [1,0 мг/кг]; n=1 каждая [0,27 и 4,0 мг/кг]). Два пациента прекратили лечение из-за клинического прогрессирования (по 1 в дозах 0,27 мг/кг и 6,0 мг/кг), два пациента были исключены (по 1 в дозах 0,5 мг/кг и 4,0 мг/кг), и один пациент прекратил лечение по решению врача (группа 1,0 мг/кг). Пять пациентов (n=3 в 1,0 мг/кг и n=2 в 0,27 мг/кг группах) прекратили лечение по "другим" причинам.

В целом 87,2% (34/39) пациентов сообщили о  $\geq 1$  TEAE, но все, кроме одного сообщенного TEAE, были признаны степени  $\leq 3$  (фиг. 7). Наиболее частым TEAE была утомляемость, о которой сообщалось у 13 (33,3%) пациентов. Все TEAE 3 степени были зарегистрированы только у 1 пациента, за исключением утомляемости 3 степени, о которой сообщалось у 2 пациентов (по 1 в группах дозирования 0,5 и 2,0 мг/кг).

Связанные с лекарственными средствами TEAE были зарегистрированы у 23 из 39 (59,0%) пациентов, из них 21 из 23 (91,3%) пациентов имели эти TEAE 1 или 2 степени тяжести. Наиболее частыми TEAE (у  $\geq 3$  пациентов) в порядке убывания частоты были тошнота (n=10); реакции, связанные с инфузией (n=8); утомляемость (n=7); алопеция (n=6); рвота (n=5); анемия и сыпь (n=4 каждая), а также снижение аппетита и стоматит (n=3 каждый). Все реакции, связанные с инфузией, были явлениями 1 или 2 степени

и были управляемыми/обратимыми.

Серьезные ТЕАЕ были зарегистрированы у 10/39 (25,6%) пациентов; у большинства (n=8) была степень 3, по 1 были степени 2 и степени 5 (сепсис 5 степени; группа дозирования 6,0 мг/кг). Никакие серьезные ТЕАЕ не возникли более чем у 1 пациента. Только 1 серьезное ТЕАЕ было сочтено связанным с лекарственным средством (гипертермия, степень 2; группа дозирования 4,0 мг/кг).

Одна ограничивающая дозу токсичность (DLT) (макулопапулезная сыпь, степень 3; разрешилась) возникла у пациента в группе дозирования 6,0 мг/кг; MTD не достигнута.

У 35 пациентов с оцениваемой опухолью наблюдают 7 PR (на основе RECIST, но включая односторонние PR, еще не подтвержденные ответы), как показано на фиг. 8. После получения выходных данных, наблюдают 3 дополнительных PR (все в группе дозирования 8,0 мг), всего 10 PR.

Компьютерную (фиг. 9 А, С и D) и позитронно-эмиссионную (фиг. 9B) томографию проводят для трех пациентов. Два пациента в группе дозирования 4,0 мг/кг продемонстрировали максимальное уменьшение размера опухоли на 36,6% (фиг. 9А) и 38,4% (фиг. 9В) через 4,5 месяца после начала лечения DS-1062a. Другой пациент в группе дозирования 2 мг/кг продемонстрировал максимальное уменьшение размера опухоли на 65,5% через 3 месяца после начала лечения DS-1062a (фиг. 9С) и заметное уменьшение количества множественных метастазов в легких (поражения вне мишени) через 3 и 7 месяцев после начала лечения (фиг. 9D).

Наилучшее доленое изменение суммы наибольших размеров от исходного уровня в поражении мишени показано на фиг. 10. Наилучшее доленое изменение (уменьшение опухоли на 68%) наблюдалось у пациента в группе дозирования 2,0 мг/кг.

Что касается фармакокинетики, системное воздействие DS-1062a увеличивалось приблизительно пропорционально дозе, как показано на фиг. 11. Уровни в плазме DS-1062a и общего анти-TROP2 антитела были аналогичными, что позволяет предположить, что DS-1062a является стабильным в кровотоке. Воздействие DXd было ниже, чем у DS-1062a.

Резюме.

Что касается конечных данных, DS-1062a переносится хорошо. Один DLT в виде кожной сыпи 3 степени, которая была преходящей и обратимой, наблюдали в группе, получавшей дозу 6,0 мг/кг. Десять PR и 16 стабильных заболеваний наблюдали с DS-1062a. Двое из пациентов с PR ранее получали лечение ингибиторами EGFR или ALK (т.е. алектинибом, кризотинибом, церитинибом, осимертинибом). Общие показатели эффективности исследования представлены на фиг. 12.

Пример 6. Фаза 1 клинического исследования на новую дату окончания сбора данных.

После первоначального сбора данных, в исследование фазы 1 были включены дополнительные пациенты, в результате чего общее количество участников достигло пятидесяти девяти (N=59). У всех пациентов были не резецированные распространенные опухоли NSCLC, которые были рецидивирующими/рефрактерными к стандартному лечению (SOC). Пациенты включали 57,7% мужчин, 88,5% имели заболевание IV стадии, 73,1% имели гистологию аденокарциномы, 80,8% имели общее состояние Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG PS), равное 1, и у 86,5% ранее было неудачное лечение ингибиторами иммунных контрольных точек. Используют такой же дизайн исследования увеличения дозы и расширения дозы.

Число пациентов в исследовании фазы 1 на новую дату окончания сбора данных с нежелательными явлениями, возникающими в связи с лечением (ТЕАЕ), независимо от причинно-следственной связи, показано на фиг. 13. Коротко, ограничивающая дозу токсичность (DLT) достигла 10 мг/кг, и максимальная переносимая доза (MTD) была установлена на уровне 8 мг/кг, что также было рекомендованной дозой для расширения дозы (RDE) в части будущего расширения дозы. Средняя продолжительность воздействия на пациентов составила 10,6 (диапазон 3,0-43,1) недели. Серьезные ТЕАЕ возникли у 14 (26,9%) пациентов, и умерли 3 (5,8%) пациента; смертельных случаев, связанных с исследуемым препаратом, не было. ТЕАЕ, связанные со снижением дозы, прерыванием или прекращением приема, возникли у 5 (9,6%), 5 (9,6%) и 2 (3,8%) пациентов, соответственно. У одного пациента (1,9%) с прогрессирующим заболеванием, получавшего дозу 6,0 мг/кг, развилось легочное нежелательное явление, представляющее особый интерес, в виде дыхательной недостаточности (степень 5), которая была признана не интерстициальной болезнью легких (ILD). Включая случаи после момента окончания сбора данных наблюдают 4 еще не установленные возможные сообщения о ILD (1 пневмонит 2 степени [6,0 мг/кг], 1 организованная пневмония 2 степени [8 мг/кг], 1 пневмонит 2 степени [8 мг/кг] и 1 5 степени [дыхательная недостаточность у пациента с прогрессирующим заболеванием; 8,0 мг/кг]).

Двенадцать (12) частичных ответов (не менее 10 подтвержденных) наблюдают для всех доз в группе повышения дозы исследования. При дозе 8 мг/кг у 5/7 пациентов наблюдают частичные ответы (PR), а у 2/7 пациентов наблюдают стабильное заболевание (SD). В этой группе 6/7 продолжили лечение. На фиг. 14 показано наилучшее доленое изменение суммы самых длинных измерений по сравнению с исходным уровнем в очагах-мишенях субъектов; На фиг. 15 показано четкое влияние дозы на частоту ответа, поскольку у пациентов в группах с более высокими дозами наблюдалось более стойкое и выраженное уменьшение размера опухоли; и на фиг. 16 показана противоопухолевая активность, наблюдаемая в различных группах лечения (обозначены пациенты, которые ранее получали лечение терапиями, таргети-

рующими EGFR, ALK и HER2.

Биопсию опухоли перед лечением оценивают с помощью иммуногистохимии для определения экспрессии TROP2, и ответы пациентов показаны на фиг. 17. Как отмечено на фигурах 12, 17, 21 и 26, некоторые пациенты ранее получали терапию ингибитором EGFR или ингибитором ALK или получали иммунную терапию онкологии. Шесть из восьми пациентов, достигших частичного ответа (PR), имеют балл H выше медианы, в то время как 8/15 со стабильным заболеванием (SD) и 4/12 с прогрессирующим заболеванием имеют балл H выше медианы. Это согласуется с доклиническими данными (см. фиг. 18), показывающими, что конъюгат антитело-лекарственное средство (1) (т.е. DS-1062a) обладает противоопухолевой активностью на моделях мышей с ксенотрансплантатом рака легких с более сильной противоопухолевой активностью в TROP2-положительных опухолях (NCI-H2170 и HCC827) в отличие от TROP2-отрицательных опухолей (Calu-6).

Изменения частот вариабельных аллелей (VAF) также определяют путем оценки внеклеточной ДНК (вкДНК). VAF проверяют на 3-м цикле, в 1-й день (C3D1) и в конце лечения (EOT). Эти результаты, которые показаны на фиг. 19, показывают, что DS-1062a снижает вкДНК у пациентов, достигших SD и PR.

Таким образом, DS-1062a хорошо переносится в дозах до 8 мг/кг, которые были определены как MTD и RDE. 10 мг/кг не переносятся, у двух пациентов был мукозит 3 степени. Хотя и 8, и 6 мг/кг хорошо переносятся, доза 8 мг/кг демонстрирует лучшие сигналы предварительной эффективности по сравнению с 6 мг/кг, с более высокой суммарной эффективностью терапии (ORR) при 8 мг/кг. Действительно, фигура 20 показывает, что ORR была лучшей в группе, получавшей дозу 8 мг/кг.

Дозозависимый эффект противоопухолевой активности наблюдают в диапазоне 2,0-8,0 мг/кг. Двенадцать (12) частичных ответов наблюдают во время увеличения дозы у ранее подвергавшихся интенсивному лечению невыбранных пациентов с NSCLC, у которых возник рецидив или прогрессирование на стандартном лечении (SOC), включая ингибиторы иммунных контрольных точек. Сводка результатов эффективности представлена на фиг. 21.

Пример 7. Предварительная эффективность конъюгата антитело-лекарственное средство.

По состоянию на 16 ноября 2019 года 88 из 95 субъектов, получавших DS-1062a, подлежали оценке на предмет ответа.

По оценке исследователя, суммарная эффективность терапии (ORR; неподтвержденная) составила 27,8% (95% CI: 9,7, 53,5) в группе дозы 6 мг/кг (5/18 субъектов с ответом, все с PR) и 38,2% (95% CI: 22,2, 56,4) в группе с дозой 8 мг/кг (13/34, все с PR) (табл. 2 и фиг. 22). Уровень контроля заболевания (DCR=CR+PR+SD) составлял 72,2% при 6 мг/кг и 79,4% при 8 мг/кг.

На дату завершения сбора данных, все 5 субъектов с PR в группе с дозой 6 мг/кг продолжали лечение без прогрессирования заболевания или смерти.

В группе с дозой 8 мг/кг 6 из 13 субъектов с PR продолжали лечение без прогрессирования заболевания или смерти; у 2 было прогрессирующее заболевание; 1 умер; и 4 прекратили прием DS-1062a по причинам, не связанным с прогрессированием заболевания или смертью.

Таблица 2

Сводная информация об оцененной исследователем суммарной эффективности терапии, частоте контроля заболевания и наилучшем общем ответе у оцениваемых субъектов по состоянию на 16 ноября 2019 г. в исследовании DS1062-A-J101 (набор для анализа оцениваемого ответа)

Переменная эффективности	Повышение дозы*			Повышение дозы+расширение дозы	Повышение дозы
	2 мг/кг (N=6)	4 мг/кг (N=6)	6 мг/кг (N=18)		
ORR (CR+PR)	1 (16,7)	2 (33,3)	5 (27,8)	13 (38,2)	1 (12,5)
95% точный CI <sup>a</sup>	0,4, 64,1	4,3, 77,7	9,7, 53,5	22,2, 56,4	0,3, 52,7
DCR (CR+PR+SD)	4 (66,7)	4 (66,7)	13 (72,2)	27 (79,4)	7 (87,5)
95% точный CI <sup>a</sup>	22,3, 95,7	22,3, 95,7	46,5, 90,3	62,1, 91,3	47,3, 99,7
BOR=наилучший объективный ответ; CI=доверительный интервал; CR=полный ответ; DCR=частота контроля заболевания; NE=не подлежит оценке; ORR=суммарная эффективность терапии; PD=прогрессирующее заболевание; PR=частичный ответ; SD=стабильное заболевание					
* При дозах ниже 2 мг/кг ответа не было, поэтому группы доз 0,27 мг/кг, 0,5 мг/кг и 1 мг/кг не представлены.					
<sup>a</sup> Использование двустороннего точного метода (Клоппера-Пирсона)					

Пациентами, пригодными для оценки ответа, были пациенты с оценкой опухоли как на исходном,



так после исходного уровня или которые прекратили лечение в рамках исследования.

Фармакокинетика.

Предварительную PK однократных и многократных доз оценивают с использованием некомпартментного анализа у 61 субъекта, получавших DS-1062a (от 0,27 мг/кг до 10 мг/кг).

На фиг. 23 показана концентрация в плазме DS-1062a, общего антитела и свободного лекарственного средства (названная полезная нагрузка на фигуре) в повторной дозе DS-1062a 8 мг/кг. Средняя  $AUC_{last}$ ,  $C_{max}$  и средний конечный период полужизни ( $t_{1/2}$ ) составляли 914 мкг·ут/мл, 196 мкг/мл и 5,45 дня, соответственно.

Уровни в плазме DS-1062a и общего анти-TROP2 антитела были одинаковыми, а воздействие свободного лекарственного средства было ниже, чем у DS-1062a, что позволяет предположить, что DS-1062a был стабильным в кровотоке.

Заключение.

В исследовании I фазы продемонстрировано, что этот DS-1062a является переносимым и безопасным при дозах до 8 мг/кг.

Из 88 субъектов, оцениваемых по эффективности, DS-1062a был эффективен при дозах 2 мг/кг или выше, достигая ORR 38,2% (13/34 субъектов) и DCR 79,4% (27/34 субъектов) в группе 8 мг/кг.

Результаты превосходят результаты доцетаксела, используемого в качестве стандартной терапии после ингибиторов иммунных контрольных точек и химиотерапии на основе платины при NSCLC (табл. 3).

Кроме того, 90,9% (20/22 субъектов) субъектов с PR ранее получали ингибиторы иммунных контрольных точек (например, ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, авелумаб, ипилимумаб, дурвалумаб), и все субъекты, ранее получали химиотерапевтические препараты на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин). Таким образом, DS-1062a продемонстрировал возможность замены доцетаксела у субъектов с NSCLC, которые невосприимчивы к этим стандартным способам лечения или не переносят их.

Кроме того, сактизумаб говитекан, конкурентный конъюгат антитело-лекарственное средство, таргетирующий TROP2, разработанный в Соединенных Штатах, имеет ORR 19% при NSCLC в исследовании фазы 2 у субъектов, получивших стандартное лечение, что позволяет предположить, что DS-1062a может быть более эффективным, чем конкурентное лекарственное средство.

Таким образом, терапевтический агент и терапевтическая фармацевтическая композиция, содержащая DS-1062a, используемые в настоящем изобретении, и терапевтический способ, отличающийся введением DS-1062a по настоящему изобретению, показали себя превосходными для лечения субъектов с неоперабельным распространенным немелкоклеточным раком легкого, который невосприимчив к стандартной терапии или рецидивирует на ней, или к которому стандартная терапия неприменима.

Безопасность и предварительная эффективность 4 мг, 6 мг и 8 мг на настоящий момент оценивают в исследовании фазы I.

Кроме того, запланированы многочисленные исследования фазы II, начало которых запланировано на 2020 год.

Таблица 3  
Сравнение эффективности DS-1062a и доцетаксела

	Показания (NSCLC)	n	ORR (95% CI)	DCR (95% CI)
DS-1062a	NSCLC после SOC все пациенты	4 мг/кг N=18	33,3% (2/6) (4,3% - 77,7%)	66,7% (4/6) (22,3% - 95,7%)
		6 мг/кг	27,8%	72,2%

		N=18	(5/18) (9,7% - 53,5%)	(13/18) (46,5% - 90,3%)
		8 мг/кг N=34	38,2% <sup>b</sup> (13/34) (22,2% - 56,4%)	79,4% (27/34) (62,1-91,3%)
Монотерапия доцетакселом <sup>1</sup>	Пациенты с NSCLC, прогрессирующие во время или после двойной химиотерапии на основе платины	N=290	12,0% (36/290) (9,0% - 17,0%)	54,0% (158/290) (не представлено)
Комбинированная терапия доцетакселом +рамуцирумабом <sup>2</sup>	Субъект с NSCLC, прогрессирующий во время или после схемы химиотерапии первой линии на основе платины.	N=628	22,9% (144/628) (От 19,7% до 26,4%)	64,0% (402/628) (От 60,1 до 67,8%)

1. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(17): 1627-39.

2. Garon EB, Ciuleanu TE, Arrieta O, et al. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial *Lancet.* 2014;384(9944):665-73, Suppl.: 3.

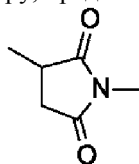
Все патенты и публикации, упомянутые в описании, указывают на уровень специалистов в данной области техники, к которой относится описание. Все патенты и публикации включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была специально и индивидуально указана для включения посредством ссылки.

Кроме того, специалист в данной области техники легко поймет, что настоящее описание хорошо адаптировано для выполнения задач и получения упомянутых, а также присущих ему целей и преимуществ. Специалистам в данной области будут очевидны его модификации и другие применения. Эти модификации охватываются сутью описания и определяются объемом формулы изобретения, которая излагает неограничивающие варианты осуществления изобретения.

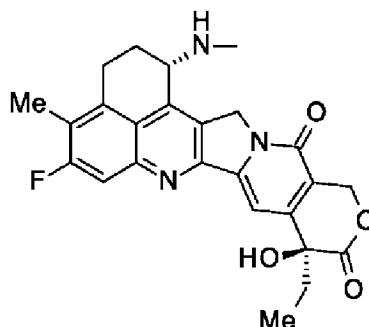
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение конъюгата анти-TROP2 антитело-лекарственное средство для лечения или профилактики рака легкого, рака груди или уротелиального рака, где конъюгат антитело-лекарственное средство содержит анти-TROP2 антитело и противоопухолевое соединение, соединенное линкером, где линкер и противоопухолевое соединение представлены следующей формулой:

-(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
где -(сукцинимид-3-ил-N)- имеет структуру, представленную следующей формулой:



который связан с антителом в его положении 3 и связан с метиленовой группой в линкерной структуре, содержащей эту структуру на атоме азота в положении 1, и (NH-DX) является группой, представленной следующей формулой:



где атом азота аминогруппы в положении 1 является соединительным положением, где анти-TROP2 антитело содержит CDRH1, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, CDRH2, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24, и CDRH3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25 в вариательной области своей тяжелой цепи, и CDRL1, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26, CDRL2, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, и CDRL3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28 в вариательной области своей легкой цепи,

где конъюгат антитело-лекарственное средство вводят субъекту, страдающему раком легкого, раком груди или уротелиальным раком, в дозе 4 мг/кг или 6 мг/кг.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что среднее количество единиц противоопухолевого соединения, конъюгированного на одно антитело, находится в диапазоне от 2 до 8 или от 3 до 8.

3. Применение по п.1 или 2, отличающееся тем, что среднее количество единиц противоопухолевого соединения, конъюгированного на антитело, составляет от 3,5 до 4,5.

4. Применение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что указанное антитело содержит вариательную область тяжелой цепи, содержащую аминокислоты 1-121 SEQ ID NO: 45, и вариательную область легкой цепи, содержащую аминокислоты 1-109 SEQ ID NO: 46.

5. Применение по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что антитело содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 46.

6. Применение по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что в анти-TROP2 антителе отсутствует лизиновый остаток на карбоксильном конце тяжелой цепи.

7. Применение по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство вводят внутривенным введением.

8. Применение по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство вводят один раз каждые 3 недели или один раз каждые 4 недели.

9. Применение по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что рак представляет собой рак легкого.

10. Применение по п.9, отличающееся тем, что раком легкого является немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

11. Применение по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что рак представляет собой рак груди.

12. Применение по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что рак представляет собой уротелиальный рак.

13. Применение по любому из пп.1-12, отличающееся тем, что рак является резистентным или рефрактерным.

14. Применение по п.13, отличающееся тем, что резистентностью или рефрактерностью является резистентность или рефрактерность, приобретенная раком в результате лечения противораковым лекарственным средством.

15. Применение по п.14, отличающееся тем, что противораковым лекарственным средством является ингибитор EGFR, ингибитор ALK, химиотерапевтический агент на основе платины или ингибитор контрольной точки.

16. Применение по п.14, отличающееся тем, что противораковым лекарственным средством является gefitinib, erlotinib, osimertinib, afatinib, alectinib, crizotinib, ceritinib, cisplatin, carboplatin, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, avelumab, ipilimumab, durvalumab, tislelizumab, sintilimab или cemiplimab.

17. Применение по любому из пп.1-16, отличающееся тем, что раком является рак, экспрессирующий TROP2.

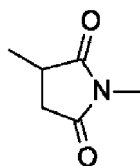
18. Применение по п.17, отличающееся тем, что раком, экспрессирующим TROP2, является рак, сверхэкспрессирующий TROP2.

19. Применение по любому из пп.1-18, отличающееся тем, что раком является неоперабельный или рецидивирующий рак.

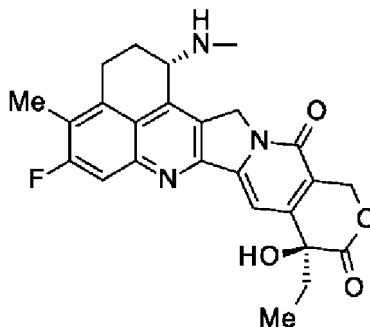
20. Применение фармацевтической композиции для лечения или профилактики рака легкого, рака груди или уротелиального рака, где фармацевтическая композиция содержит конъюгат антитело-

лекарственное средство, содержащий анти-TROP2 антитело и противоопухолевое соединение, соединенное линкером, где линкер и противоопухолевое соединение представлены следующей формулой:

-(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
где -(сукцинимид-3-ил-N)- имеет структуру, представленную следующей формулой:



который связан с антителом в его положении 3 и связан с метиленовой группой в линкерной структуре, содержащей эту структуру на атоме азота в положении 1, и (NH-DX) является группой, представленной следующей формулой:

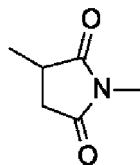


где атом азота аминогруппы в положении 1 является соединительным положением, где анти-TROP2 антитело содержит CDRH1, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, CDRH2, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24, и CDRH3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25 в варибельной области своей тяжелой цепи, и CDRL1, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26, CDRL2, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, и CDRL3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28 в варибельной области своей легкой цепи, и фармацевтически приемлемый компонент состава;

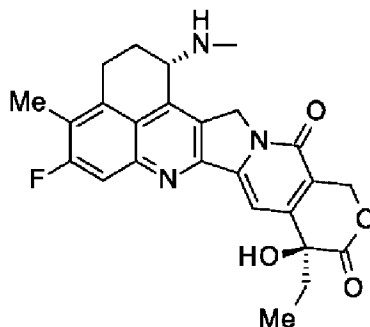
где конъюгат антитело-лекарственное средство в фармацевтической композиции вводят субъекту, страдающему раком легкого, раком груди или уротелиальным раком, в дозе 4 мг/кг или 6 мг/кг.

21. Способ лечения или профилактики рака легкого, рака груди или уротелиального рака у субъекта, включающий введение субъекту с раком конъюгата анти-TROP2 антитело-лекарственное средство, содержащего анти-TROP2 антитело и противоопухолевое соединение, соединенные линкером, где линкер и противоопухолевое соединение представлены следующей формулой:

-(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
где -(сукцинимид-3-ил-N)- имеет структуру, представленную следующей формулой:



который связан с антителом в его положении 3 и связана с метиленовой группой в линкерной структуре, содержащей эту структуру на атоме азота в положении 1, и (NH-DX) является группой, представленной следующей формулой:



где атом азота аминогруппы в положении 1 является соединительным положением, где анти-TROP2

антитело содержит CDRH1, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, CDRH2, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24, и CDRH3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25 в варибельной области своей тяжелой цепи, и CDRL1, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26, CDRL2, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, и CDRL3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28 в варибельной области своей легкой цепи, где конъюгат антитело-лекарственное средство вводят субъекту, страдающему раком легкого, раком груди или уротелиальным раком, в дозе 4 мг/кг или 6 мг/кг.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что среднее количество единиц противоопухолевого соединения, конъюгированного на одно антитело, находится в диапазоне от 2 до 8 или от 3 до 8.

23. Способ по п.21 или 22, отличающийся тем, что среднее количество единиц противоопухолевого соединения, конъюгированного на одно антитело, составляет от 3,5 до 4,5.

24. Способ по любому из пп.21-23, отличающийся тем, что антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислоты 1-121 SEQ ID NO: 45, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислоты 1-109 SEQ ID NO: 46.

25. Способ по любому из пп.21-24, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 46.

26. Способ по любому из пп.21-25, отличающийся тем, что в анти-TROP2 антителе отсутствует лизиновый остаток на карбоксильном конце тяжелой цепи.

27. Способ по любому из пп.21-26, отличающийся тем, что дозу конъюгата антитело-лекарственное средство 4 мг/кг вводят субъекту, страдающему раком.

28. Способ по любому из пп.21-26, отличающийся тем, что дозу конъюгата антитело-лекарственное средство 6 мг/кг вводят субъекту, страдающему раком.

29. Способ по любому из пп.21-28, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство вводят внутривенным введением.

30. Способ по любому из пп.21-29, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство вводят один раз каждые 3 недели или один раз каждые 4 недели.

31. Способ по любому из пп.21-30, отличающийся тем, что рак представляет собой рак легкого.

32. Способ по п.31, отличающийся тем, что раком легкого является немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

33. Способ по любому из пп.21-30, отличающийся тем, что рак представляет собой рак груди.

34. Способ по любому из пп.21-30, отличающийся тем, что рак представляет собой уротелиальный рак.

35. Способ по любому из пп.21-34, отличающийся тем, что рак является резистентным или рефрактерным.

36. Способ по п.35, отличающийся тем, что резистентностью или рефрактерностью является резистентность или рефрактерность, приобретенная раком в результате лечения противораковым лекарственным средством.

37. Способ по п.36, отличающийся тем, что противораковым лекарственным средством является ингибитор EGFR, ингибитор ALK, химиотерапевтический агент на основе платины или ингибитор контрольной точки.

38. Способ по п.36, отличающийся тем, что противораковым лекарственным средством является гефитиниб, эрлотиниб, осимертиниб, аффатиниб, алектиниб, кризотиниб, церитиниб, цисплатин, карбоплатин, ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, авелумаб, ипилимумаб, дурвалумаб, тислелизумаб, синтилимаб или цемиплимаб.

39. Способ по любому из пп.21-38, отличающийся тем, что раком является рак, экспрессирующий TROP2.

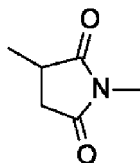
40. Способ по п.39, отличающийся тем, что раком, экспрессирующим TROP2, является рак, сверхэкспрессирующий TROP2.

41. Способ по любому из пп.21-40, отличающийся тем, что раком является неоперабельный или рецидивирующий рак.

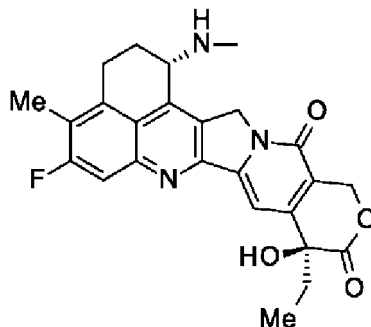
42. Способ по любому из пп.21-41, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство вводят в фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один фармацевтически приемлемый компонент состава.

43. Применение конъюгата анти-TROP2 антитело-лекарственное средство в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики рака легкого, рака груди или уротелиального рака, где конъюгат антитело-лекарственное средство содержит анти-TROP2 антитело и противоопухолевое соединение, соединенное линкером, где линкер и противоопухолевое соединение представлены следующей формулой:

-(сукцинимид-3-ил-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
где -(сукцинимид-3-ил-N)- имеет структуру, представленную следующей формулой:



который связан с антителом в его положении 3 и связан с метиленовой группой в линкерной структуре, содержащей эту структуру на атоме азота в положении 1, и (NH-DX) является группой, представленной следующей формулой:



где атом азота аминогруппы в положении 1 является соединительным положением, где анти-TROP2 антитело содержит CDRH1, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, CDRH2, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24, и CDRH3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25 в вариательной области своей тяжелой цепи, и CDRL1, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26, CDRL2, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, и CDRL3, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28 в вариательной области своей легкой цепи,

где конъюгат антитело-лекарственное средство вводят субъекту, страдающему раком легкого, раком груди или уротелиальным раком, в дозе 4 мг/кг или 6 мг/кг.

44. Применение по п.43, отличающееся тем, что среднее количество единиц противоопухолевого соединения, конъюгированного на одно антитело, находится в диапазоне от 2 до 8 или от 3 до 8.

45. Применение по п.43 или 44, где среднее количество единиц противоопухолевого соединения, конъюгированного на антитело, составляет от 3,5 до 4,5.

46. Применение по любому из пп.43-45, отличающееся тем, что антитело содержит вариательную область тяжелой цепи, содержащую аминокислоты 1-121 SEQ ID NO: 45, и вариательную область легкой цепи, содержащую аминокислоты 1-109 SEQ ID NO: 46.

47. Применение по любому из пп.43-46, отличающееся тем, что антитело содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 46.

48. Применение по любому из пп.43-47, отличающееся тем, что в анти-TROP2 антителе отсутствует лизиновый остаток на карбоксильном конце тяжелой цепи.

49. Применение по любому из пп.43-48, отличающееся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство вводят путем внутривенного введения.

50. Применение по любому из пп.43-49, отличающееся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство вводят один раз каждые 3 недели или один раз каждые 4 недели.

51. Применение по любому из пп.43-50, где рак представляет собой рак легкого.

52. Применение по п.51, отличающееся тем, что раком легкого является немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

53. Применение по любому из пп.43-50, отличающееся тем, что рак представляет собой рак груди.

54. Применение по любому из пп.43-50, отличающееся тем, что рак представляет собой уротелиальный рак.

55. Применение по любому из пп.43-54, где рак является резистентным или рефрактерным.

56. Применение по п.55, отличающееся тем, что резистентностью или рефрактерностью является резистентность или рефрактерность, приобретенная раком в результате лечения противораковым лекарственным средством.

57. Применение по п.56, отличающееся тем, что противораковым лекарственным средством является ингибитор EGFR, ингибитор ALK, химиотерапевтический агент на основе платины или ингибитор контрольной точки.

58. Применение по п.56, отличающееся тем, что противораковым лекарственным средством является gefitinib, erlotinib, osimertinib, afatinib, alectinib, crizotinib, ceritinib, cisplatin, carboplatin, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, avelumab, ipilimumab, durvalumab, tislelizumab, sintilimab или cemiplimab.

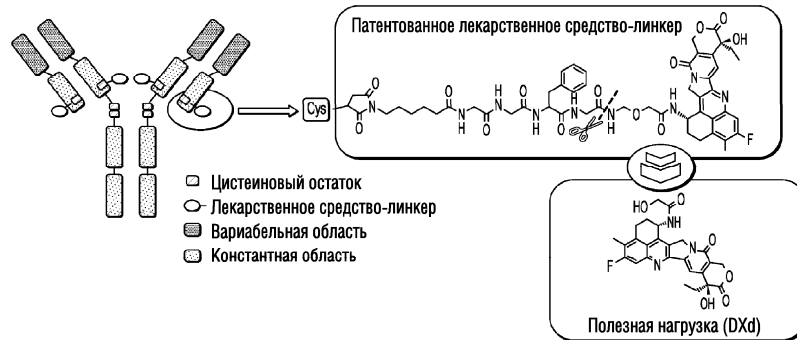
59. Применение по любому из пп.43-58, отличающееся тем, что раком является рак, экспрессирую-

щий TROP2.

60. Применение по п.59, отличающееся тем, что раком, экспрессирующим TROP2, является рак, сверхэкспрессирующий TROP2.

61. Применение по любому из пп.43-60, где раком является неоперабельный или рецидивирующий рак.

62. Применение по любому из пп.43-61, где конъюгат антитело-лекарственное средство вводят в фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один фармацевтически приемлемый компонент состава.



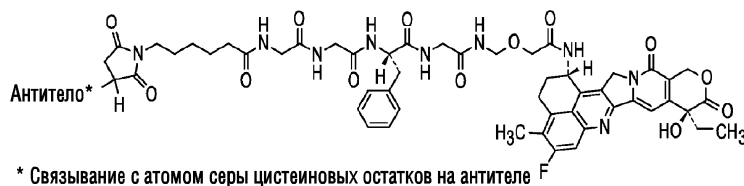
Фиг. 1

#### Тяжелая цепь

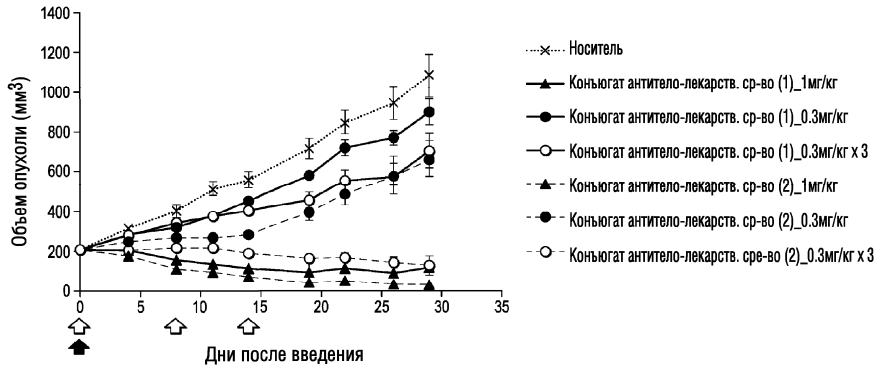
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT YAGMQWVRQA PGQGLEWMGW  
INTHSGVPKY AEDFKGRVTI SADTSTSTAY LQLSSLKSED TAVYYCARSG  
FGSSYWYFDV WQGTLVTVS DADTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV  
KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ  
TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK  
PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY  
NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKARKQPREP  
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP  
VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG  
K (SEQ ID NO: 45)

#### Легкая цепь

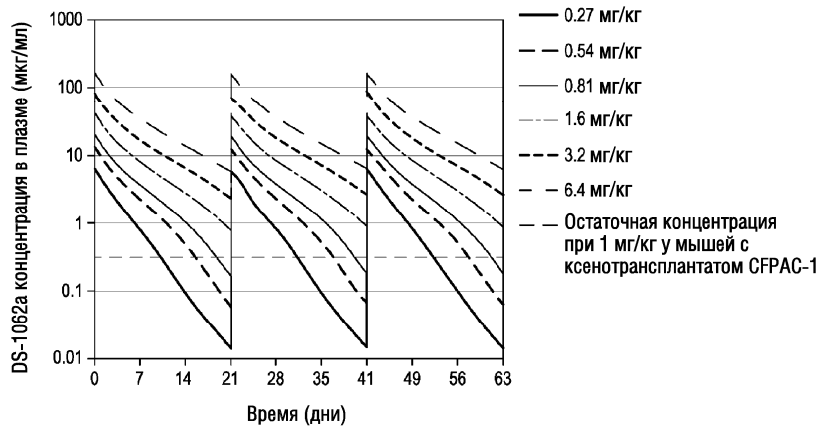
DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS  
ASYRYTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFAVYYCQQ HYITPLTFGQ  
GTKLEIKRTV AAPSVEFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV  
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG  
LSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO: 46)



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



\*RDE используют для дополнительных субъектов для подтверждения дозы.  
 DLT, ограничивающая дозу токсичность; NSCLC, немелкоклеточный рак легких; POC, доказательство концепции; Q3W, каждые 3 недели; RDE, рекомендованная доза для расширения; SOC, стандарт лечения; TROP2, антиген клеточной поверхности трофобластной клетки 2

Фиг. 5



Параметр	DS-1062a доза, мг/кг							Всего (N=39)
	0.27 (n=4)	0.5 (n=5)	1.0 (n=7)	2.0 (n=6)	4.0 (n=6)	6.0 (n=8)	8.0 (n=3)	
Пол мужской, n(%)	1 (25.0)	3 (60.0)	4 (57.1)	4 (66.7)	2 (33.3)	6 (75.0)	3 (100)	23 (59.0)
Возраст, лет, средний (диапазон)	64.0 (28-75)	66.0 (45-73)	67.0 (57-74)	60.5 (42-70)	60.5 (38-72)	53.5 (47-60)	69.0 (49-71)	60.0 (28-75)
Страна, n(%)								
США	2 (50.0)	4 (80.0)	5 (71.4)	4 (66.7)	5 (83.3)	5 (62.5)	1 (33.3)	26 (66.7)
Япония	2 (50.0)	1 (20.0)	2 (28.6)	2 (33.3)	1 (16.7)	3 (37.5)	2 (66.7)	13 (33.3)
Стадия при вступл. в исслед., n(%)								
IIA	0	0	0	0	0	1 (12.5)	0	1 (2.6)
IIIA	0	0	0	1 (16.7)	0	0	1 (33.3)	2 (5.1)
IVA	1 (25.0)	1 (20.0)	0	0	3 (50.0)	3 (37.5)	0	8 (20.5)
IVB	0	3 (60.0)	5 (71.4)	2 (33.3)	2 (33.3)	0	1 (33.3)	13 (33.3)
Другое <sup>б</sup>	3 (75.0)	1 (20.0)	2 (28.6)	3 (50.0)	1 (16.7)	4 (50.0)	1 (33.3)	15 (38.5)
Гистология, n(%)								
Аденокарцинома	4 (100)	3 (60.0)	6 (65.7)	4 (66.7)	3 (50.0)	6 (75.0)	3 (100)	29 (74.4)
Крупноклеточный	0	0	0	0	1 (16.7)	0	0	1 (2.6)
Другое	0	1 (20.0) <sup>с</sup>	0	0	0	0	0	1 (2.6)
Плоскоклеточный	0	1 (20.0)	1 (14.3)	2 (33.3)	2 (33.3)	2 (25.0)	0	8 (20.5)
ECOG PS, n(%)								
0	0	1 (20.0)	2 (28.6)	0	2 (33.3)	2 (25.0)	1 (33.3)	8 (20.5)
1	4 (100)	4 (80.0)	5 (71.4)	6 (100)	4 (66.7)	6 (75.0)	2 (66.7)	31 (79.5)

\*n=3 EGFR мутации и n=2 ALK мутации; \* Стадия IV; \*TNM T2,2; 2,0 нМ  
ECOG P5, оценка состояния по Eastern Cooperative Oncology Group; EGFR, рецептор эпидермального фактора роста, NSCLC, немелкоклеточный рак легких.

Фиг. 6

TEAE, n(%)	N=39	
	Все степени	Степень $\geq 3^a$
Любые TEAE	34 (87.2)	16 (41.0)
TEAE, по предпочтению ( $y \geq 10\%$ пациентов)		
Утомляемость	13 (33.3)	2 (5.1)
Тошнота	12 (30.8)	0
Анемия	9 (23.1)	0
Пониженный аппетит	9 (23.1)	0
Облысение	8 (20.5)	0
Реакция, связанная с инфузией	8 (20.5)	0
Констипация	6 (15.4)	0
Рвота	6 (15.4)	0
Кашель	5 (12.8)	0
Диспноэ	5 (12.8)	1 (2.6)
Сыпь	5 (12.8)	0
НЕКОДИРОВАННЫЕ	5 (12.8)	1 (2.6)
Диарея	4 (10.3)	0
Боль	4 (10.3)	1 (2.6)
Снижение массы тела	4 (10.3)	0

\*Большинство TEAE имеют степень 3 (n=6, 20,5%), за исключением одного степени 2 и одного степени 5 (сепсис 5 степени; группа лечения 6,0 мг/кг).  
TEAE, нежелательные явления, возникшие в ходе лечения

Фиг. 7

Параметр	DS-1062a доза, мг/кг							Всего (N=35)
	0.27 (n=4)	0.5 (n=5)	1.0 (n=7)	2.0 (n=6)	4.0 (n=5)	6.0 (n=7)	8.0 (n=1)	
Наилуч. общий ответ, n(%)								
PR <sup>с</sup>	0	0	0	1 (16.7)	2 (40.0)	3 (42.9)	1 (100)	7 (20.6)
SD	0	1 (25.0)	6 (85.7)	3 (50.0)	2 (40.0)	4 (57.1)	0	16 (47.1)
PD	4 (100)	3 (75.0)	1 (14.3)	2 (33.3)	1 (20.0)	0	0	11 (32.4)

\*По RECIST, но включая односточечные PR, не подтвержденные ответы.  
PR, прогрессирующее заболевание; PR, частичный ответ; SD, стабильное заболевание

Фиг. 8

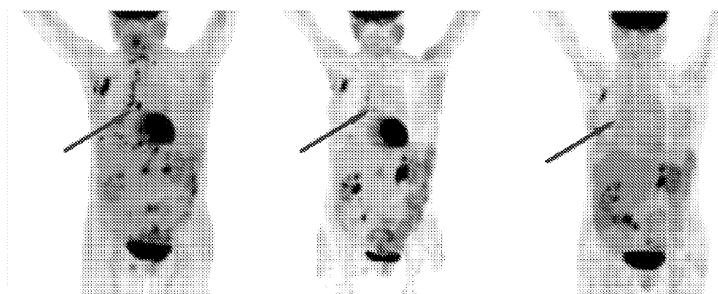
A. Снижение размера поражения-мишени у пациента, леченного 4,0 мг/кг DS-1062a



Исходный уровень: Начало 4,0 мг/кг DS-1062a

После 6 цикла: Через 4,5 месяцев лечения.  
Максимальная доля снижения размера опухоли 36,6%

B. Снижение размера поражения-мишени у другого пациента, леченного 4,0 мг/кг DS-1062a

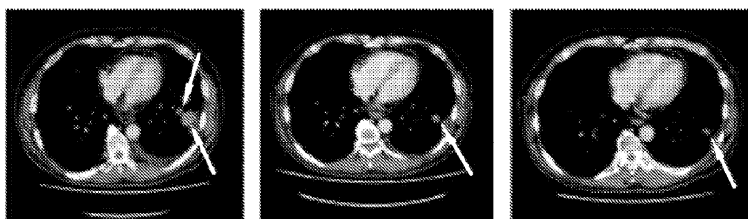


Исходный уровень:  
Начало 4,0 мг/кг DS-1062a

После 2 цикла: Через 6 недель лечения

После 6 цикла: Через 18 недель лечения (продолжающийся PR).  
Максимальная доля снижения размера опухоли 36,4%

C. Снижение размера поражения-мишени у пациента, леченного 2,0 мг/кг DS-1062a

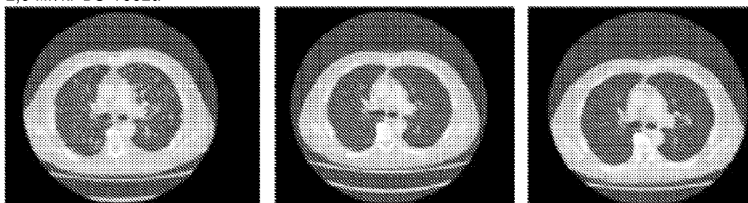


Исходный уровень:  
Начало 2,0 мг/кг DS-1062a

После 4 цикла: Через 3 месяца лечения.  
Максимальная доля снижения размера опухоли 65,5%

После 10 цикла: Через 7 месяцев лечения.  
Максимальная доля снижения размера опухоли 62,0%

D. Снижение размера поражения вне мишени у тот же пациента (на панели C), леченного 2,0 мг/кг DS-1062a

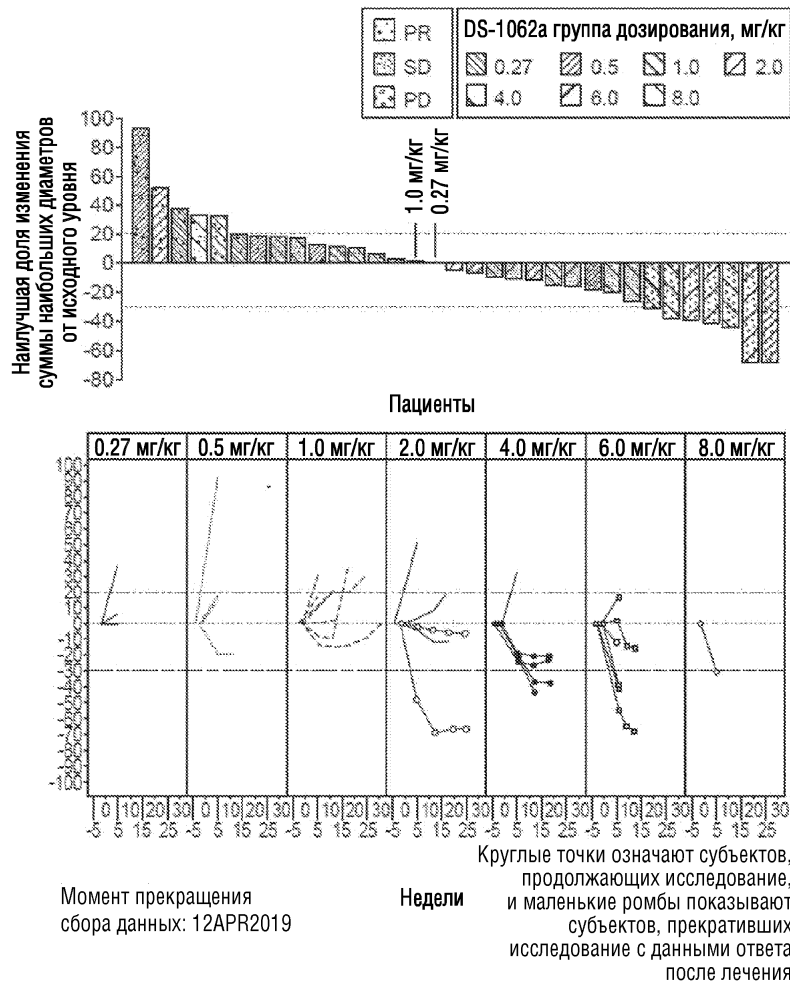


Исходный уровень:  
Начало 2,0 мг/кг DS-1062a

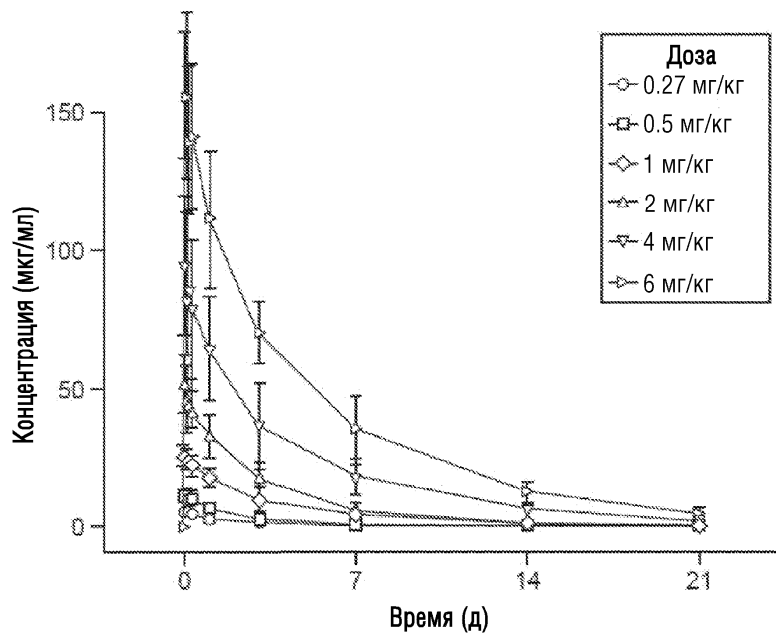
После 4 цикла: Через 3 месяца лечения

После 10 цикла: Через 7 месяцев лечения

Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

Всего дозировано 44 субъекта, 10 PR

Когорта	Наилучший ORR %	Длительность ответа	Статус	Кол-во предшествующих противораковых схем	Предшествующие лечения EGFR-ТКИ/ALK/СР1
4 (2.0 мг/кг)	-68.5%	30 недель	Продолжает	5	ТКИ (ГЕФИТИНИБ, ЭРЛОТИНИБ и ОСИМЕРТИНИБ)
5 (4.0 мг/кг)	-37.6%	13 недель	Продолжает	9	ALK (КРИЗОТИНИБ, АЛЕКТИНИБ и ЦЕРИТИНИБ)
6 (6.0 мг/кг)	-67.7%	11 недель	Продолжает	3	СР1 (ДУРВАЛУМАБ)
6 (6.0 мг/кг)	-52.3%	10 недель	Продолжает	3	СР1 (НИВОЛУМАБ)
6 (6.0 мг/кг)	-50.0%	8 недель	Продолжает	2	СР1 (АВЕЛУМАБ)
5 (4.0 мг/кг)	-43.8%	7 недель	Продолжает	3	СР1 (НИВОЛУМАБ)
7 (8.0 мг/кг)	-30.8%	4 недели	Продолжает	5	СР1 (НИВОЛУМАБ)
7 (8.0 мг/кг)	-56.4%	2 недели	Продолжает	4	СР1 (НИВОЛУМАБ и ДУРВАЛУМАБ)
7 (8.0 мг/кг)	-40.5%	2 недели	Продолжает	3	СР1 (АТЕЗОЛИЗУМАБ)
7 (8.0 мг/кг)	-30.5%	1 неделя	Продолжает	8	СР1 (АТЕЗОЛИЗУМАБ)

Суммарная эффективность терапии

Когорта	Доза	к-во PR к-во субъектов	ORR%
4	2.0 мг/кг	1/6	16.7%
5	4.0 мг/кг	2/6	33.3%
6	6.0 мг/кг	3/8	37.5%
7	8.0 мг/кг	4/4	100%*

\*4 субъекта в когорте 7 имеют PR на первых отслеживающих сканах. Оставшиеся субъекты когорты будут сканированы в конце мая/июня 2019

Фиг. 12

TEAE независимо от причины ( $y \geq 10\%$ пациентов, $n(\%)$ (N=52))						
	Все степени		Степень $\geq 3$	Все степени		Степень $\geq 3$
Любые TEAE	48 (92.3)	22 (42.3)	Констипация	7 (13.5)	0	
Утомляемость	19 (36.5)	2 (3.8)	Кашель	7 (13.5)	0	
Тошнота	19 (36.5)	0	Диарея	7 (13.5)	0	
Облысение	15 (28.8)	0	Повышенная ALT	6 (11.5)	0	
Пониженный аппетит	14 (26.9)	0	Снижение массы тела	6 (11.5)	0	
Анемия	12 (23.1)	0	Обезвоживание	5 (9.6)	0	
Стоматит/воспаление слизистой	12 (23.1)	2 (3.8)	Диспноэ	5 (9.6)	1 (1.9)	
Рвота	12 (23.1)	0	Головная боль	5 (9.6)	0	
Реакция, связанная с инфузией	11 (21.2)	0	Боль	5 (9.6)	1 (1.9)	
Сыпь	8 (15.4)	0				

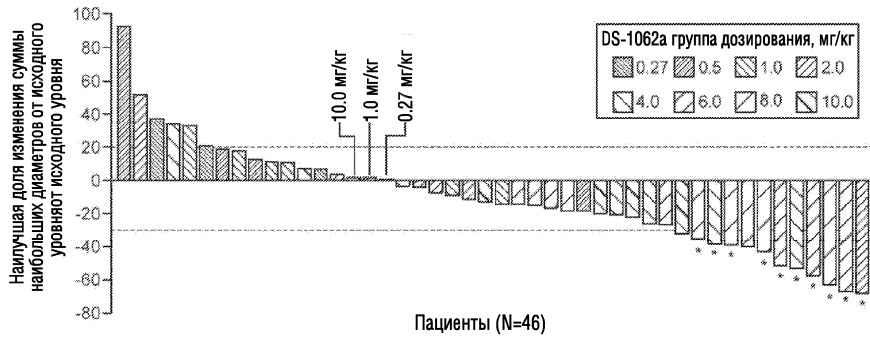
Момент прекращения сбора данных: 3 июля 2019

- DLT достигнута при 1- мг/кг; <sup>a</sup> MTD при 8 мг/кг также является RDE, средняя длительность воздействия составляет 10,6 (диапазон 3,0-43,1) недель
- Серьезные TEAE возникают у 14 (26,9%) пациентов и 3 (5,8%) пациентов умирают; ни одна из смертей не связана с исследуемым лекарственным средством
- TEAE ассоциированные со снижением дозы, прерывание или прекращение у 5 (9,6%) и 2 (3,8%) пациентов, соответственно
- У одного пациента (1,9%) с прогрессированием заболевания, леченного дозой 6,0 мг/кг развилось легочное нежелательное явление, представляющее особый интерес, дыхательной недостаточности (степень 5), которое оценили как не ILD
- Включая случаи после момента окончания сбора данных наблюдают 4 еще не установленные возможные сообщения о ILD (1 пневмонит 2 степени [6,0 мг/кг], 1 организованная пневмония 2 степени [8 мг/кг], 1 пневмонит 2 степени [8 мг/кг] и 1 5 степени [дыхательная недостаточность у пациента с прогрессированием заболевания; 8,0 мг/кг]).

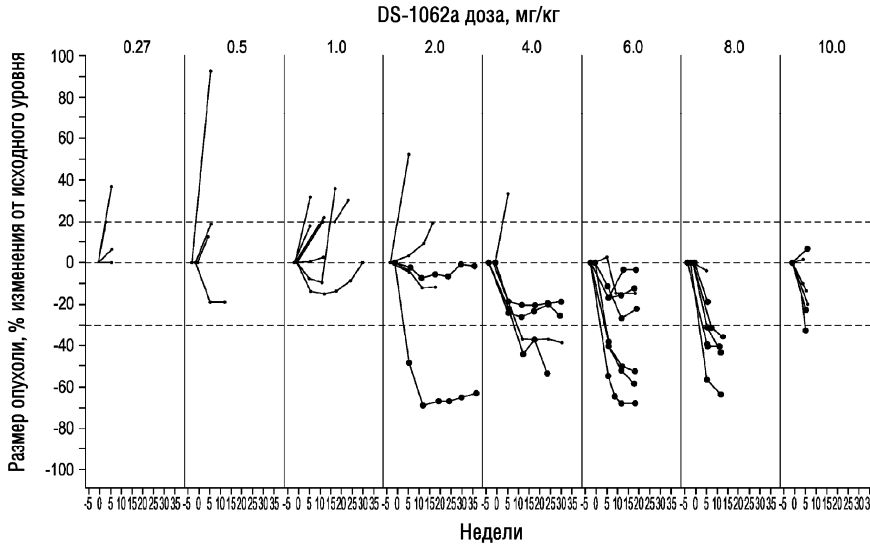
<sup>a2</sup> DLT возникают в дозе 10 мг/кг; 1 пациент с воспалением слизистой и 1 пациент со стоматитом. Одна DLT возникает в дозе 6 мг/кг у пациента с макулопапулезной сыпью.  
<sup>b</sup> Наиболее частым TEAE, ведущим к снижению дозы, было воспаление слизистой (2 пациента (3,8%), группа 10 мг/кг)  
<sup>c</sup> TEAE, ведущим к прекращению дозирования (каждое у 1 пациента) является плевральный выпот (0,27 мг/кг) и боль (2,0 мг/кг)

ALT, аланинаминотрансфераза; DLT, токсичность, ограничивающая дозу; ILD, интерстициальная болезнь легких; MTD, максимальная переносимая доза; PD, прогрессирующее заболевание; Pt, пациент; RDE, рекомендованная доза для расширения; TEAE, нежелательные явления, возникшие в ходе лечения

Фиг. 13



Фиг. 14

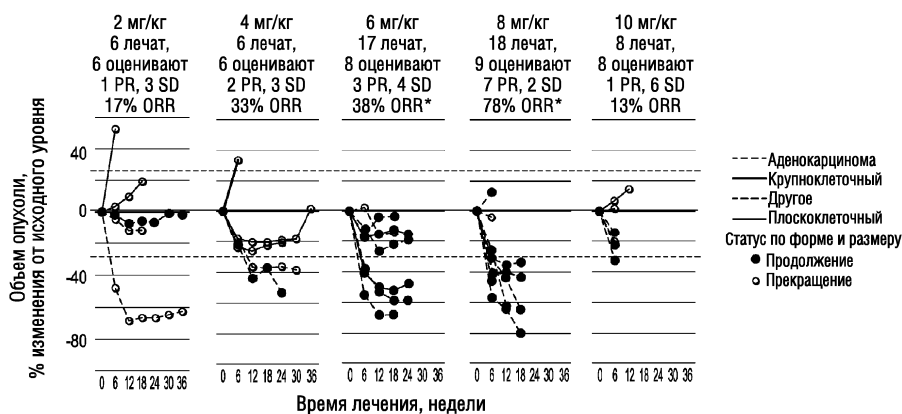


Фиг. 15



Фиг. 16





\*ORR у 6, 8 мг/кг на основе пациентов с, по меньшей мере, 6 н с C1D1

Фиг. 20

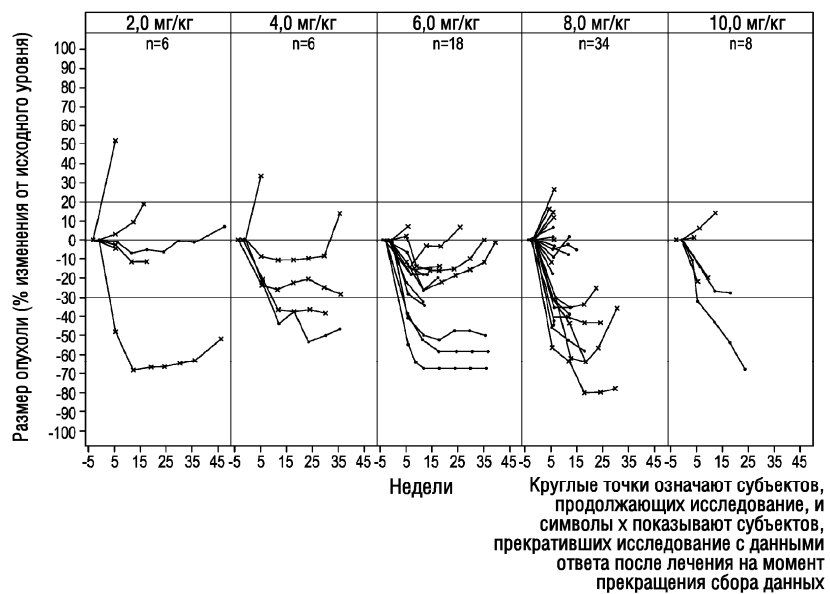
Всего дозировано 44 субъекта, 10 PR

Когорта	Наилучший ORR %	Длительн. ответа	Статус	Кол-во предшеств. противораков. схем	Предшествующие лечения EGFR-ТКИ/ALK/СР1
4 (2.0 мг/кг)	-68.5%	41 неделя	Прекращает	5	ТКИ (ГЕФИТИНИБ, ЭРЛОТИНИБ И ОСИМЕРТИНИБ)
5 (4.0 мг/кг)	-37.6%	18 недель	Прекращает	9	ALK (КРИЗОТИНИБ, АЛЕКТИНИБ И ЦЕРИТИНИБ)
6 (6.0 мг/кг)	-67.7%	25 недель	Продолжает	3	СР1 (ДУРВАЛУМАБ)
6 (6.0 мг/кг)	-58.5%	24 недели	Продолжает	3	СР1 (НИВОЛУМАБ)
6 (6.0 мг/кг)	-53.3%	22 недели	Продолжает	2	СР1 (АВЕЛУМАБ)
5 (4.0 мг/кг)	-53.1%	21 неделя	Продолжает	3	СР1 (НИВОЛУМАБ)
7 (8.0 мг/кг)	-64.1%	18 недель	Продолжает	5	СР1 (НИВОЛУМАБ)
7 (8.0 мг/кг)	-80.0%	16 недель	Продолжает	4	СР1 (НИВОЛУМАБ И ДУРВАЛУМАБ)
7 (8.0 мг/кг)	-43.2%	16 недель	Продолжает	3	СР1 (АТЕЗОЛИЗУМАБ, АВЕЛУМАБ)
7 (8.0 мг/кг)	-35.5%	15 недель	Продолжает	8	СР1 (АТЕЗОЛИЗУМАБ)
8 (10.0 мг/кг)	-32.1%	7 недель	Продолжает	6	СР1 (НИВОЛУМАБ, АТЕЗОЛИЗУМАБ)
7 (8.0 мг/кг)	-62.0%	6 недель	Продолжает	6	СР1 (НИВОЛУМАБ)
7 (8.0 мг/кг)	-39.7%	6 недель	Прекращает	3	СР1 (КЕЙТРУДА)
7 (8.0 мг/кг)	-46.0%	1 неделя	Продолжает	4	СР1 (НИВОЛУМАБ)

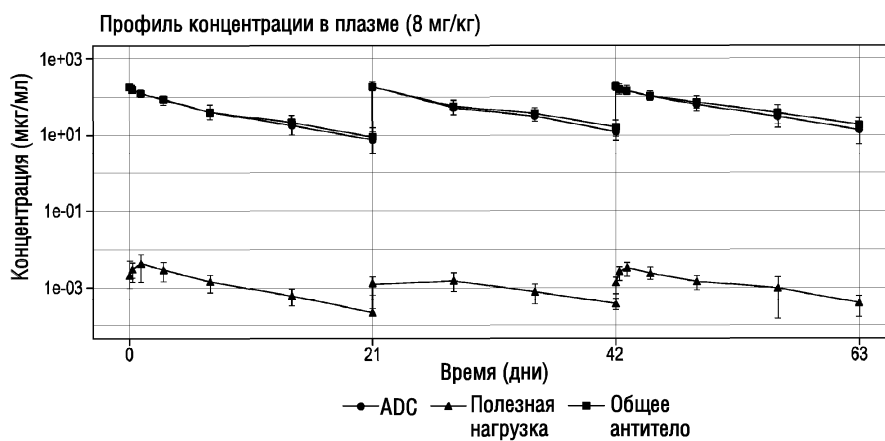
Суммарная эффективность терапии

Когорта	Доза	к-во PR к-во субъектов	ORR%
4	2.0 мг/кг	1/6	17%
5	4.0 мг/кг	2/6	33%
6	6.0 мг/кг	3/8	38%
7	8.0 мг/кг	7/9	78%
8	10.0 мг/кг	1/8	13%

Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23

