

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490741 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.07.09

(22) Дата подачи заявки  
2022.09.22

(51) Int. Cl. C07K 16/30 (2006.01)  
A61K 47/68 (2017.01)  
A61K 31/4745 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СПОСОБ ЕГО  
ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202111116842.X

(32) 2021.09.23

(33) CN

(86) PCT/CN2022/120481

(87) WO 2023/046003 2023.03.30

(71) Заявитель:

ШАНХАЙ ХАНСОХ БИОМЕДИКАЛ  
КО., ЛТД.; ЦЗЯНСУ ХАНСОХ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ ГРУП КО.,  
ЛТД.; ЧАНЧЖОУ ХАНСОХ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)

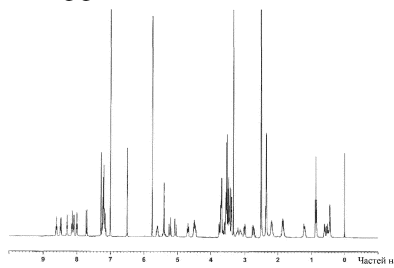
(72) Изобретатель:

Мао Дунцзе, Се Юецзюнь, Чэнь Лили  
(CN)

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

(57) Предложены конъюгат антитело-лекарственное средство, способ его получения и его фармацевтическое применение и, в частности, конъюгат антитело к TROP-2-лекарственное средство и его фармацевтическое применение. Конъюгат антитело-лекарственное средство образован посредством соединения антитела к TROP-2 или его антигенсвязывающего фрагмента и производного экситекана с помощью линкера, при этом конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение характеризуются значительным противоопухолевым эффектом и надлежащей безопасностью.



A1

202490741

202490741

A1

## КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

5 Настоящее изобретение относится к области биомедицины. Конкретно, настоящее изобретение относится к конъюгату на основе антитела к TROP-2 и его применению в медицине.

### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

10 По мере постоянного углубления исследований в области геномики, протеомики и сигнальных путей опухолей, для людей становится все более понятным взаимодействие онкогенов и генов-супрессоров опухолей в опухолевых клетках и их влияние на микроокружение опухоли. Это также делает возможным разработку новых схем противоопухолевого лечения в случае конкретных молекулярных мишеней опухолей.

15 Молекулярная таргетная терапия опухолей представляет собой новую модель лечения, которая отличается от традиционных хирургического вмешательства, лучевой терапии и химиотерапии и обладает преимуществами, заключающимися в том, что лекарственное средство, как правило, связывается только с соответствующим сайтом-мишенью и уничтожает или подавляет клетки-мишени путем непосредственного  
20 воздействия на функцию молекулы-мишени или посредством физической или химической эффекторной молекулы, которая им переносится. За счет их ярко выраженных сайтов-мишеней данный тип лекарственных средств, как правило, обладает высокой селективностью и может эффективно уничтожать или подавлять клетки-мишени, при этом не вызывая или вызывая лишь незначительные побочные эффекты, связанные с  
25 токсичностью, в отношении клеток здоровых тканей. Таким образом, разработка молекулярных таргетных лекарственных средств стала актуальным направлением в клинических исследованиях рака.

Поверхностный антиген 2 клеток трофобласта человека (TROP-2) представляет собой клеточный поверхностный гликопротеин, кодируемый геном TACSTD2. TROP-2  
30 состоит из 323 аминокислот, включающих сигнальный пептид, который состоит из 26 аминокислот, внеклеточную область, которая состоит из 248 аминокислот, трансмембранную область, которая состоит из 23 аминокислот, и цитоплазматическую область, которая состоит из 26 аминокислот. Во внеклеточном домене TROP-2 содержится 4 неоднородных сайта *N*-связанного гликозилирования. После добавления  
35 углеводных цепей средняя молекулярная масса увеличивается на 11–13 кДа. В семействе генов TACSTD внеклеточный домен содержит характерную

последовательность тиреоглобулина (ТГ), которую, как правило, считают связанной с пролиферацией, инфильтрацией и метастазированием раковых клеток.

5           Значительное количество клинических исследований и литературных данных продемонстрировали, что TROP-2 сверхэкспрессируется при различных карциномах, таких как рак желудка, рак легкого, рак толстой кишки, рак яичника, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак печени и рак пищевода. В противоположность этому, TROP-2 редко экспрессируется или вообще не экспрессируется в здоровых тканях у взрослых, при этом небольшая степень экспрессии ограничена клетками области эпителия, а уровень экспрессии также ниже, чем при раке, что указывает на связь TROP-2 с неоплазией. Сверхэкспрессия TROP-2 в опухолевых тканях тесно связана с неблагоприятным прогнозом у пациентов и метастазированием раковых клеток и также влияет на общий уровень выживаемости пациентов. Следовательно, TROP-2 стал перспективной мишенью в молекулярной таргетной терапии опухолей.

15           Сообщалось о нескольких исследованиях противоопухолевых эффектов антител к hTROP-2:

          В патенте США № 5840854 сообщается о цитотоксичности конъюгированного с цитотоксином моноклонального антитела к hTROP-2 (BR110) в отношении линий раковых клеток человека H3619, H2987, MCF-7, H3396 и H2981.

20           В патенте США № 6653104 раскрыто антитело (RS7), которое испытывали на модели *in vivo* с применением антитела, меченного радиоактивными веществами. Антитело продемонстрировало противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели бестимусных мышей, но о противоопухолевом эффекте отдельного немеченого антитела не сообщалось.

25           В патенте США № 7420040 также сообщается, что выделенное моноклональное антитело, продуцируемое линией гибридных клеток AR47A6.4.2 или AR52A301.5, полученных в результате иммунизации мышей тканью рака яичника человека, было конъюгировано с hTROP-2 и продемонстрировало противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели бестимусных мышей.

30           В CN 102827282A раскрыто генетически сконструированное антитело IgG к TROP-2 человека и его применение. Результаты тестирования *in vitro* продемонстрировали, что антитело IgG к TROP-2 характеризовалось значительным ингибирующим эффектом в отношении пролиферации клеток рака поджелудочной железы.

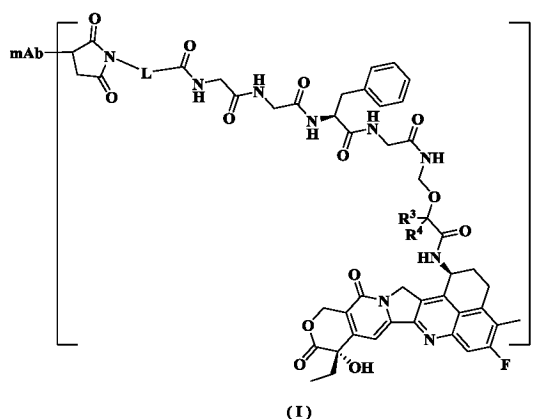
          В CN 104114580A раскрыты антитело (в частности, гуманизированное антитело), которое специфично реагирует с hTROP-2 и обладает противоопухолевой активностью *in vivo*, а также гибридома, которая продуцирует антитело, комплекс антитела с

лекарственным средством, фармацевтическая композиция для диагностики или лечения опухоли, способ выявления опухоли и набор для выявления или диагностики опухоли.

Однако весьма затруднительным является выявление моноклональных антител с высокой аффинностью, высокой специфичностью и высокой цитотоксичностью или активностью в отношении уничтожения/подавления/регрессии опухоли. Таким образом, по-прежнему существует насущная необходимость в разработке антител к Tgp-2 и других иммунотерапевтических средств с надлежащей эффективностью, высокой безопасностью и подходящих для пациентов-людей.

## 10 КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Целью настоящего изобретения является обеспечение конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли или сольватного соединения:



15 где

L представляет собой  $-(CR^1R^2)_m-[X_1-(CR^1R^2)_n-X_2]_t-(CR^1R^2)_r-$ ;

каждый из  $R^1$  или  $R^2$  независимо выбран группы, состоящей из атома водорода, дейтерия, гидроксила, амина, алкила, галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила и гидроксиалкила, предпочтительно  $R^1$  или  $R^2$  представляет собой атом водорода;

20 каждый из  $X_1$  или  $X_2$  независимо выбран из группы, состоящей из связи, N, O и S; предпочтительно  $X_1$  или  $X_2$  представляет собой связь или O,

каждый из m, n, r или t независимо выбран из группы, состоящей из 1, 2, 3 или 4; предпочтительно каждый из m, n, r или t независимо выбран из группы, состоящей из 1 или 2;

25 каждый из  $R^3$  или  $R^4$  независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, гетероциклила, арила или гетероарила;

или  $R^3$  и  $R^4$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

у равен 1-20, предпочтительно 1-10, более предпочтительно 2-8 и еще более предпочтительно 4, 6 или 8;

mAb представляет собой антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент.

5 В предпочтительном воплощении настоящего изобретения каждый из  $R^1$  или  $R^2$  независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, дейтерия, гидроксила, amino,  $C_{1-3}$  алкила, галогена,  $C_{1-3}$  галогеналкила,  $C_{1-3}$  дейтерированного алкила и  $C_{1-3}$  гидроксилалкила, предпочтительно  $R^1$  или  $R^2$  представляет собой атом водорода;

каждый из  $X_1$  или  $X_2$  независимо выбран из группы, состоящей из связи, N, O и S;  
10 предпочтительно  $X_1$  или  $X_2$  представляет собой связь или O,

каждый из m, n или g независимо выбран из группы, состоящей из 1, 2, 3 или 4; предпочтительно каждый из m, n или g независимо выбран из группы, состоящей из 1 и 2;

каждый из  $R^3$  или  $R^4$  независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, галогена,  $C_{1-3}$  галогеналкила,  $C_{1-3}$  дейтерированного алкила,  $C_{3-6}$  циклоалкила, 4-8-членного гетероциклила,  $C_{5-10}$  арила или 4-8-членного гетероарила, предпочтительно  
15 каждый из  $R^3$  или  $R^4$  независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода и  $C_{3-6}$  циклоалкила;

или  $R^3$  и  $R^4$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют  $C_{3-6}$  циклоалкил или 4-8-членный гетероциклил.

20 В еще одном предпочтительном воплощении настоящего изобретения антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в RIDPXDSETHYNQKFKD, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8,

25 X выбран из группы, состоящей из R, Y, Q, L, T, I, F, E и A.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 9, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как  
30 показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 10, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 11, и  
35 HCDR3, показанную под SEQ ID NO: 5; и LCDR1, показанную под SEQ ID NO: 6, LCDR2, показанную под SEQ ID NO: 7, и LCDR3, показанную под SEQ ID NO: 8; или

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 12, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

5 HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 13, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 14, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

10 HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 15, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

15 HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 16, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 17, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8.

20 В предпочтительном воплощении настоящего изобретения представлены конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение в соответствии с настоящим изобретением, где антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из мышинового антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, химерного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, антитела человека или его антигенсвязывающего  
25 фрагмента, гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения представлены конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение в соответствии с настоящим изобретением, где антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константную  
30 область тяжелой цепи, полученную из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, или ее вариант.

В еще одном предпочтительном воплощении настоящего изобретения антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константную область тяжелой цепи, полученную из IgG1, IgG2 или IgG4 человека, или ее вариант.

35 В еще одном предпочтительном воплощении настоящего изобретения антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения представлены конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение в соответствии с настоящим изобретением, где антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константную область легкой цепи, полученную из каппа-цепи или лямбда-цепи антитела человека, или ее вариант.

В еще одном предпочтительном воплощении настоящего изобретения антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константную область легкой цепи, полученную из каппа-цепи антитела человека.

В еще одном предпочтительном воплощении настоящего изобретения антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат константную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 2.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из следующей последовательности, или переменную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью со следующей последовательностью: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения представлены конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение в соответствии с настоящим изобретением, где антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 19 или обладающую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 19.

В еще одном предпочтительном воплощении настоящего изобретения антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

переменную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

переменную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 20, и переменную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

переменную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

переменную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

переменную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 23, и переменную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

вариабельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 24, и вариабельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

вариабельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 25, и вариабельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

5 вариабельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 26, и вариабельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

вариабельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19.

10 В предпочтительном воплощении настоящего изобретения антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из следующей последовательности, или тяжелую цепь, обладающую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью со следующей последовательностью: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37.

15 В предпочтительном воплощении настоящего изобретения антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, выбранную из группы, состоящей из следующей последовательности, или легкую цепь, обладающую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью со следующей последовательностью: SEQ ID NO: 29.

20 В предпочтительном воплощении настоящего изобретения антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 28, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

25 тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 31, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 32, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

30 тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 34, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

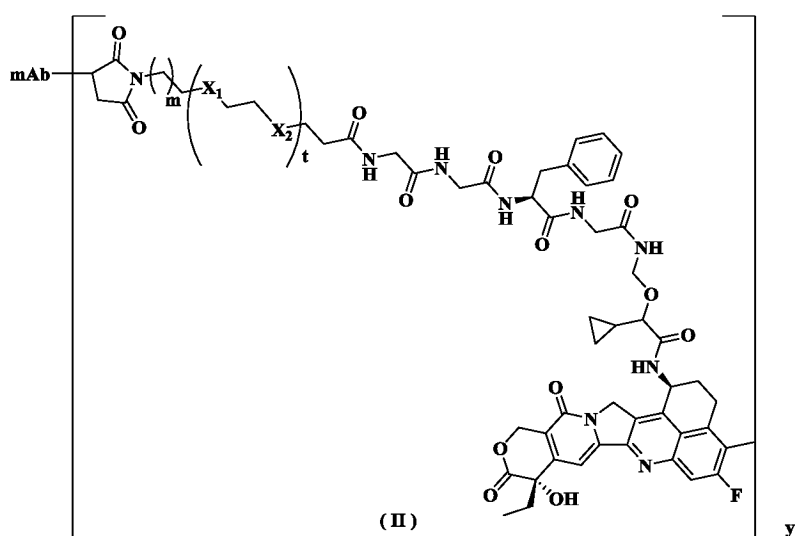
35 тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 35, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 36, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или



тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 37, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29.

В еще одном предпочтительном воплощении настоящего изобретения представлены конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение в соответствии с настоящим изобретением, где конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение выбраны из группы, состоящей из конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы (II) или его фармацевтически приемлемой соли, сольватного соединения, таутомера, мезомера, рацемата, энантиомера или диастереомера и их смеси:

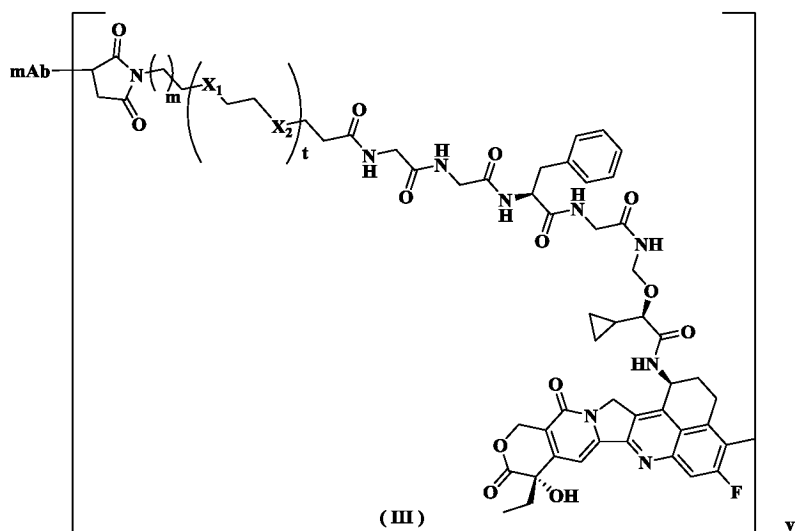


$X_1$  или  $X_2$  представляет собой связь или O;

$m$  равен 0 или 1; и

$t$  равен 1 или 2.

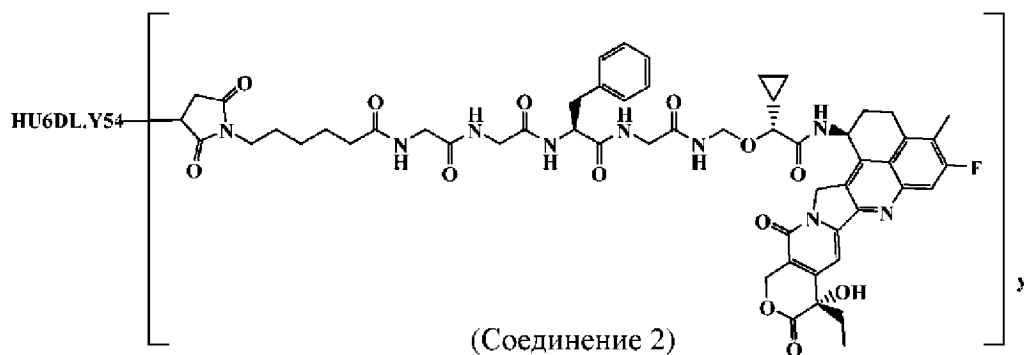
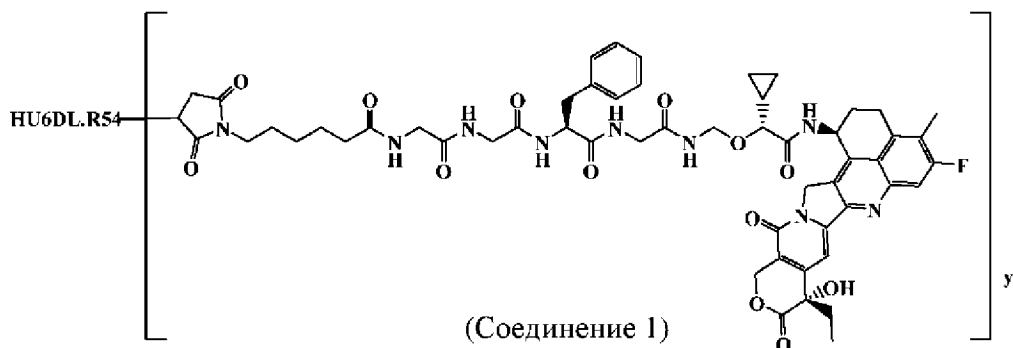
В еще одном предпочтительном воплощении настоящего изобретения представлены конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение в соответствии с настоящим изобретением, где конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение выбраны из группы, состоящей из конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы (III) или его фармацевтически приемлемой соли или сольватного соединения:

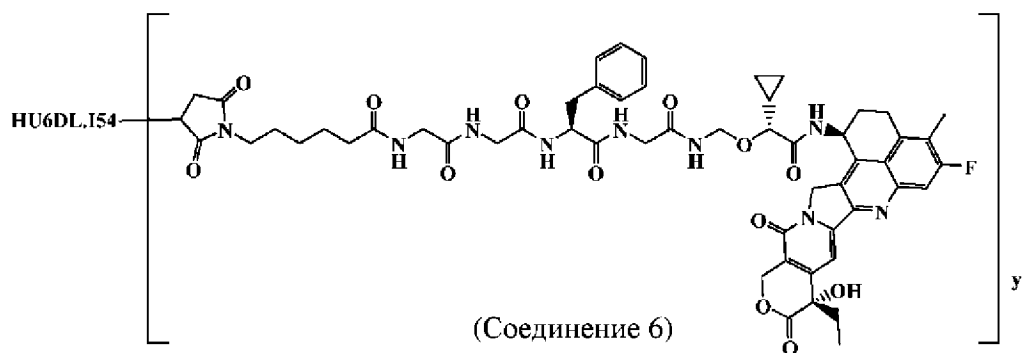
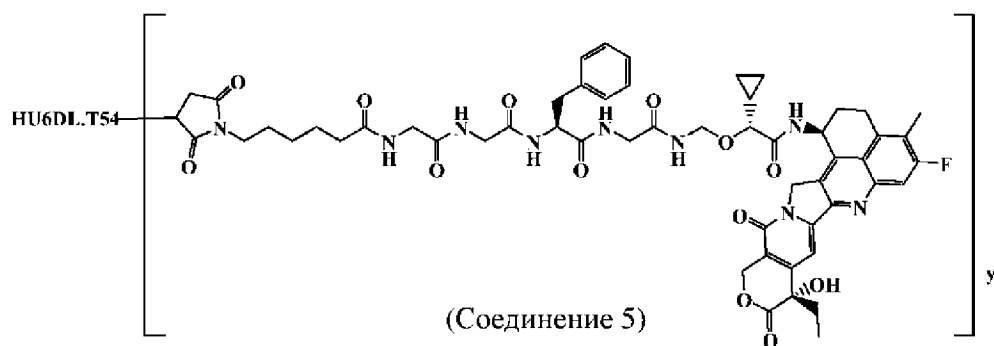
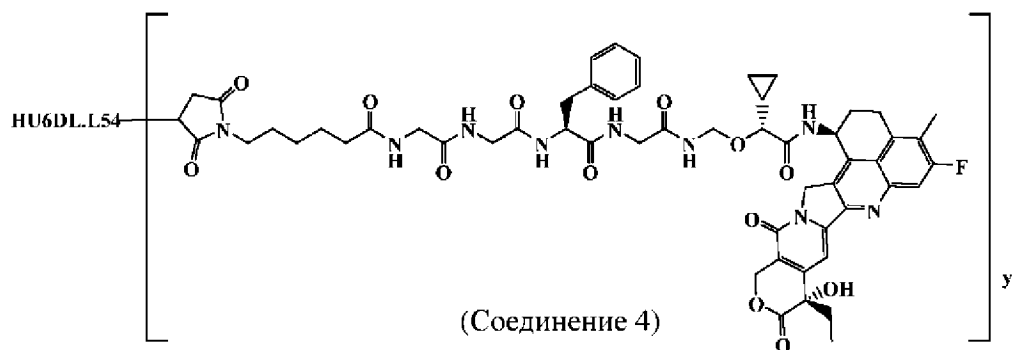
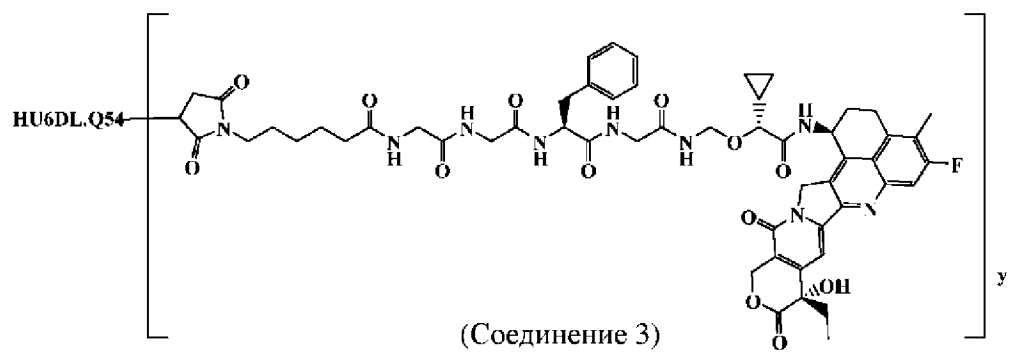


mAb выбрано из группы, состоящей из вышеуказанного антитела к TROP-2 или его антигенсвязывающего фрагмента,

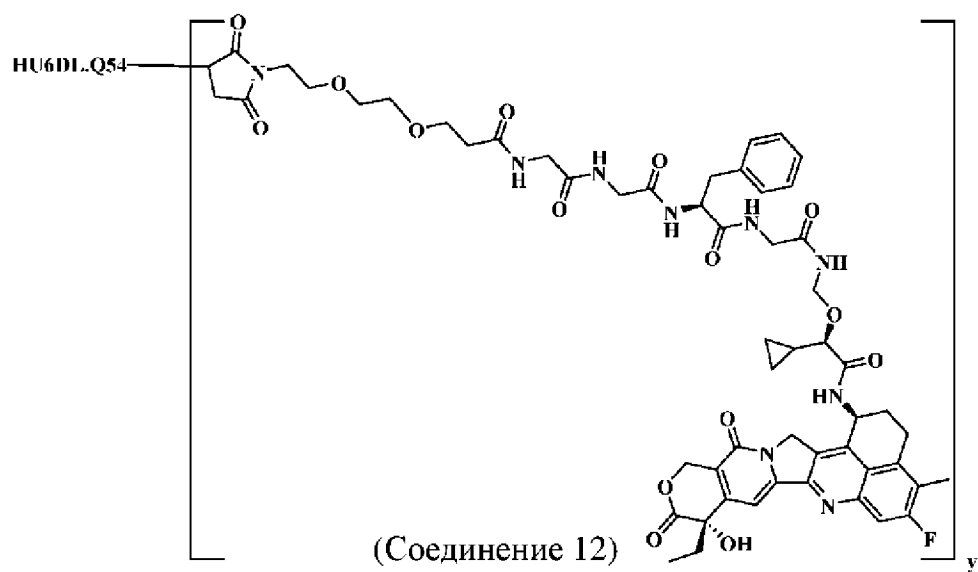
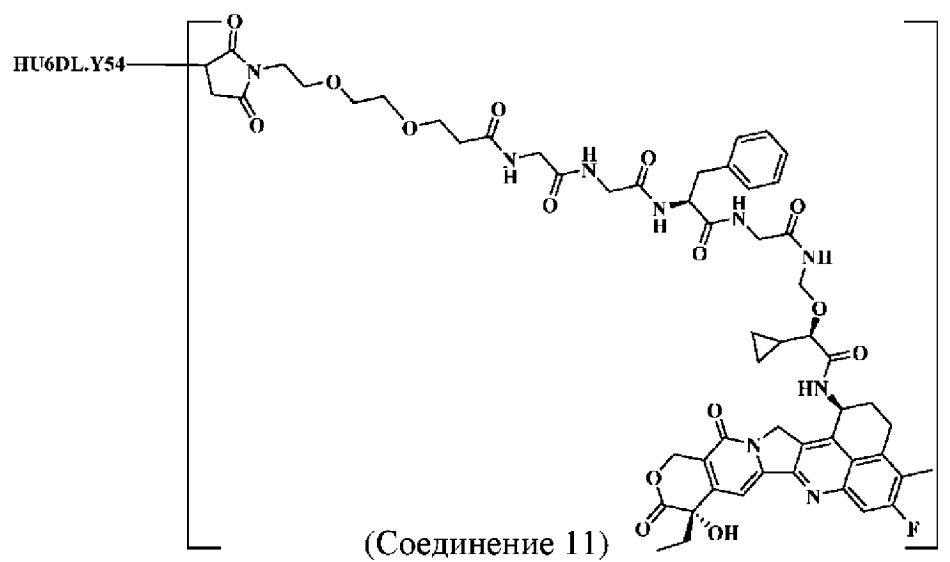
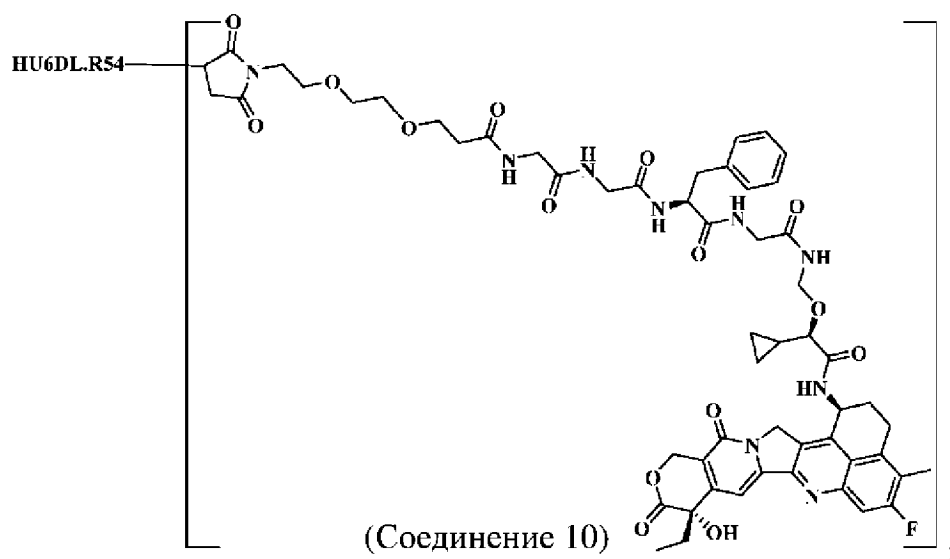
у выбран из группы, состоящей из 2-10, предпочтительно 4-10, более предпочтительно 4, 6, 8 или 10.

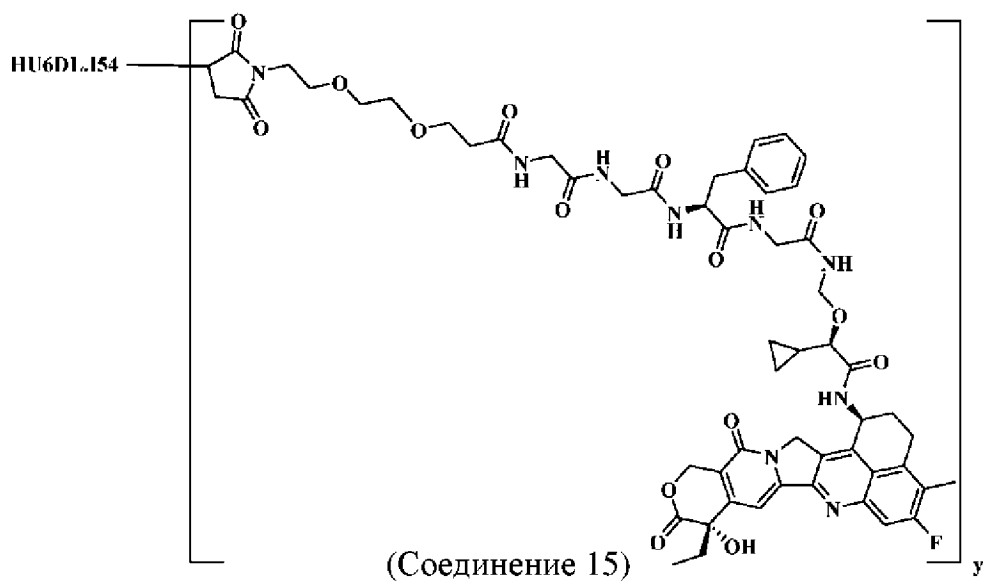
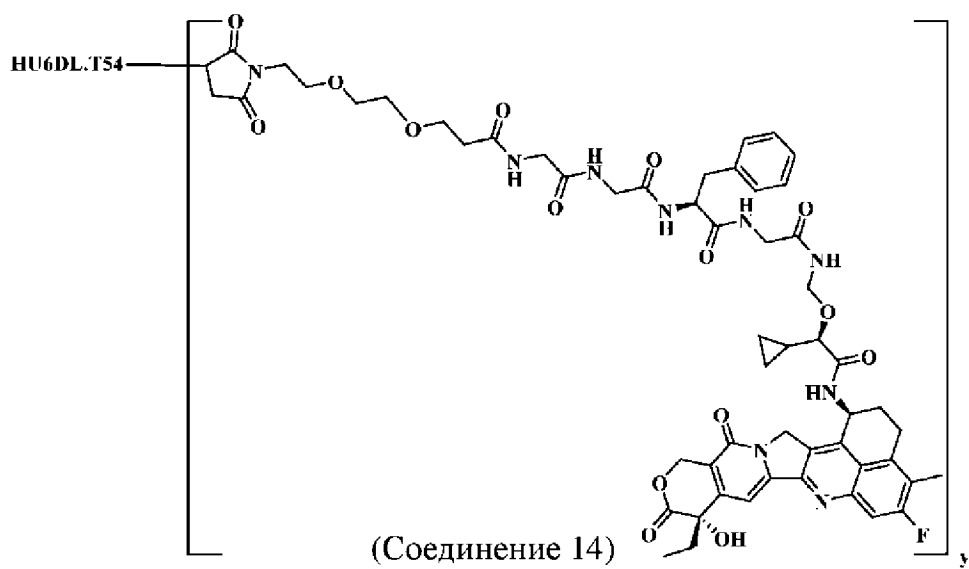
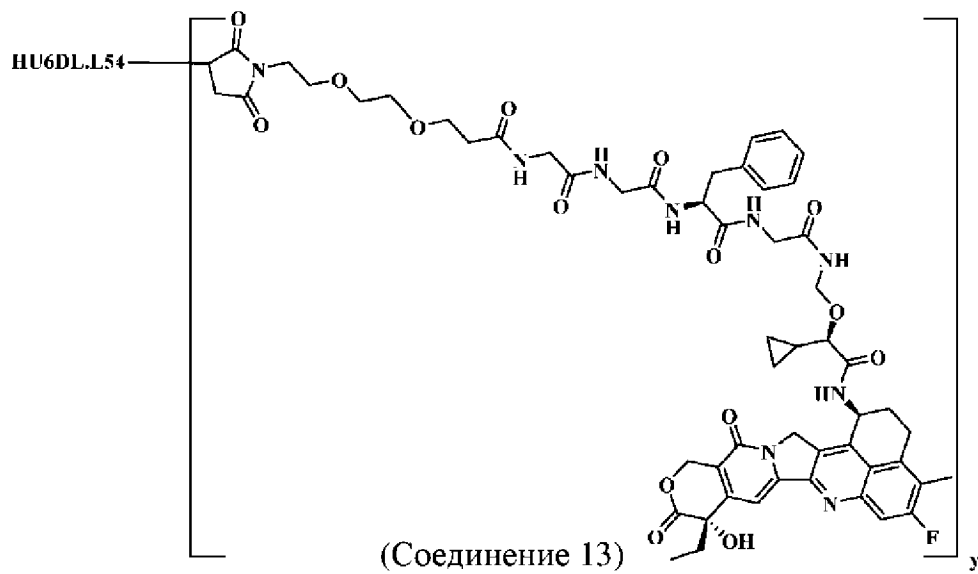
В еще одном предпочтительном воплощении настоящего изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение выбраны из группы, состоящей из следующих структур:

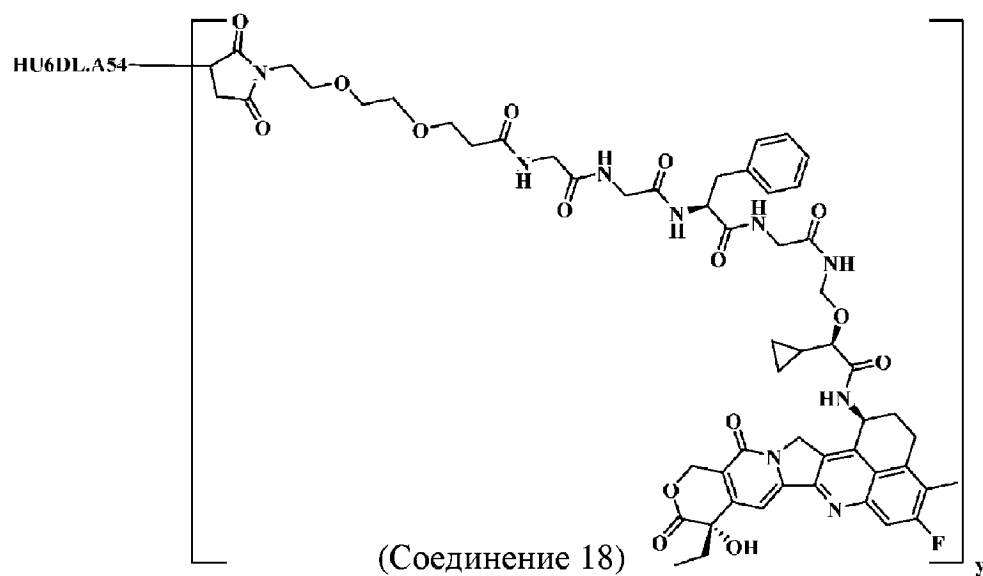
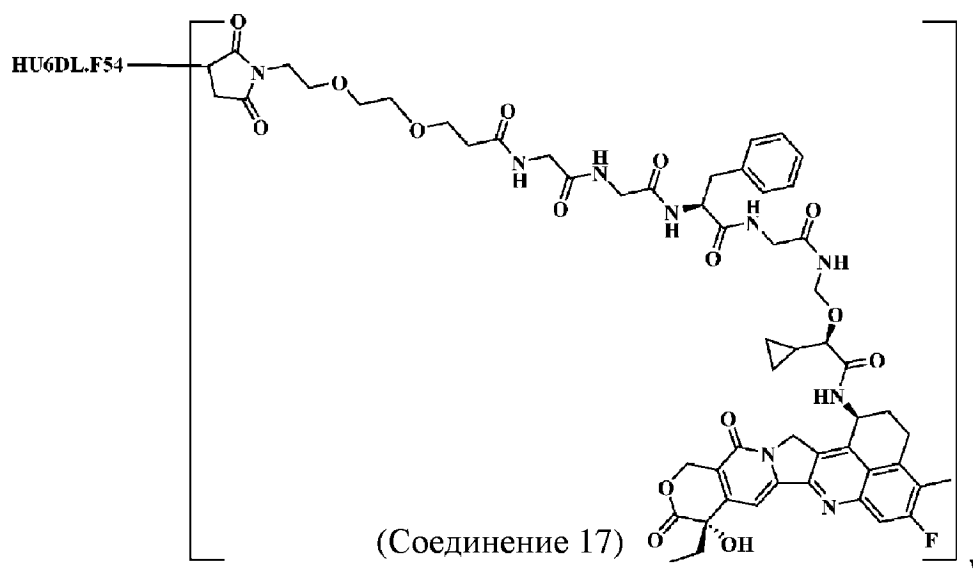
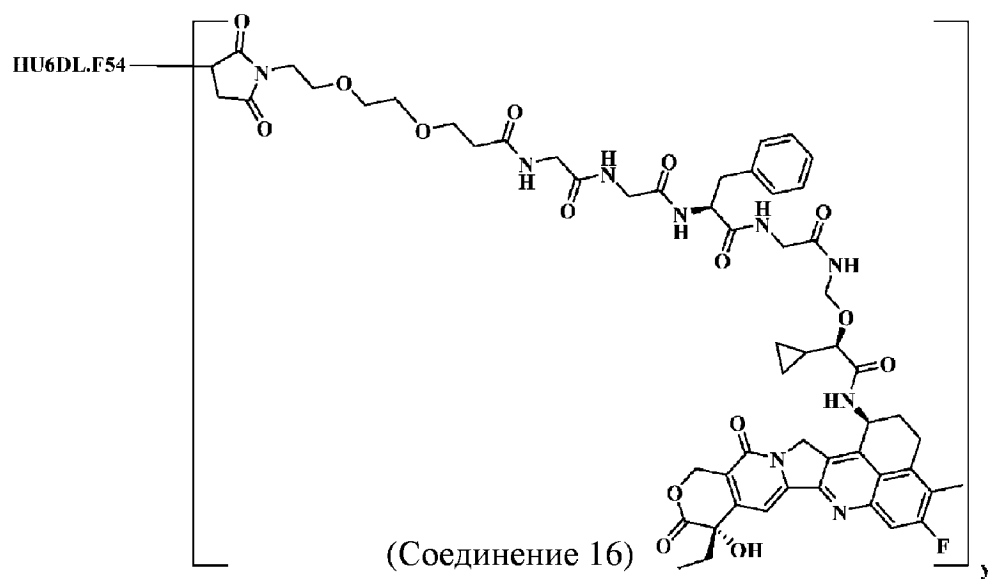






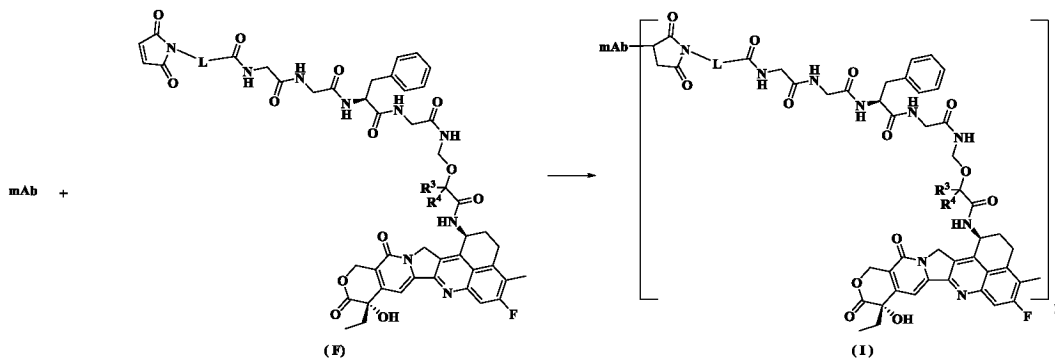






где у представляет собой такой, как определено в пункте 1.

В настоящем изобретении также представлен способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли или сольватного соединения, включающий следующие стадии:



восстановление mAb и затем обеспечение конъюгирования восстановленного mAb с соединением общей формулы (F) с получением соединения общей формулы (I);

где L представляет собой такой, как определено выше;

mAb выбрано из группы, состоящей из вышеуказанного антитела к TROP-2 или его антигенсвязывающего фрагмента;

у равен 1-20; предпочтительно 4-10; более предпочтительно 4, 6, 8 или 10.

В другом аспекте настоящего изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по настоящему изобретению и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, разбавителей или носителей.

В другом аспекте настоящего изобретения представлено фармацевтическое применение. Настоящее изобретение относится к применению конъюгата антитело к TROP-2-лекарственное средство или фармацевтически приемлемой соли или сольватного соединения конъюгата антитело-лекарственное средство или содержащей их фармацевтической композиции для лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованного TROP-2.

В другом аспекте настоящего изобретения дополнительно представлено применение конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы (I) или фармацевтически приемлемой соли или сольватного соединения конъюгата антитело-лекарственное средство или содержащей их фармацевтической композиции в получении лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с TROP-2 человека.

В более предпочтительном воплощении настоящего изобретения заболевание, связанное с TROP-2 человека, представляет собой рак с высоким уровнем экспрессии TROP-2, и рак выбран из группы, состоящей из трижды негативного рака молочной железы, мелкоклеточного рака легкого, уротелиальной карциномы, астроглиобластомы



головного мозга человека, фарингеального рака человека, опухолей надпочечника, СПИД-ассоциированного рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитомы, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, метастатических опухолей головного мозга, рака молочной железы, опухолей каротидного тельца, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной карциномы, рака толстой кишки, колоректального рака, десмопластической мелкоклеточной карциномы, клеточной неоплазии, эпендимомы, опухоли Юинга, внескелетной миксоидной хондросаркомы, остеофиброзной дисплазии, остеофиброзной дисплазии, карциномы желчного пузыря или холангиокарциномы, рака желудка, гестационной трофобластической болезни, герминогенной опухоли, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, опухоли островковых клеток, саркомы Капоши, рака почки, лейкоза, липосаркомы, злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легкого, медуллобластомы, меланомы, менингиомы, множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринных опухолей, рака яичника, рака поджелудочной железы, папиллярного рака щитовидной железы, аденомы паращитовидной железы, рака у детей, опухоли оболочки периферического нерва, фагоцитомы, опухолей гипофиза, рака предстательной железы, задней увеальной меланомы, метастазирующего рака почки, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточной карциномы, синовиальной саркомы, плоскоклеточной карциномы, карциномы тимуса, тимомы, метастатического рака щитовидной железы и рака матки.

Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по настоящему изобретению могут специфично связываться с антигеном-мишенью, обладают высокой эффективностью эндоцитоза и длительным периодом полужизни *in vivo*, а также могут в значительной степени уничтожать опухоли, обеспечивая при этом безопасность.

Конъюгат антитело-лекарственное средство и его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по настоящему изобретению обладают значительным противоопухолевым эффектом и надлежащей безопасностью, а также обладают надлежащей метаболической активностью *in vivo*, длительным фармацевтическим эффектом *in vivo* и перспективами широкого клинического применения.

## **Подробное описание настоящего изобретения**

### **1. Терминология**

Для более легкого понимания настоящего изобретения ниже представлены конкретные определения некоторых технических и научных терминов. Если четко не указано иное в другом месте данного документа, все другие технические и научные

термины, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Трехбуквенные и однобуквенные коды аминокислот, используемые в настоящем изобретении, представляют собой такие, как описано в J. Biol. Chem, 243, p3558 (1968).

5 Термин "антитело" относится к иммуноглобулину, который представляет собой структуру из четырех пептидных цепей, состоящую из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей, соединенных межцепочечными дисульфидными связями. Поскольку аминокислотный состав и последовательность расположения константной области тяжелой цепи иммуноглобулина являются разными, антигенность  
10 иммуноглобулина также отличается. Соответственно, иммуноглобулин может быть разделен на пять классов или изоформ иммуноглобулинов, а именно IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, и их соответствующими тяжелыми цепями являются  $\mu$ -цепь,  $\delta$ -цепь,  $\gamma$ -цепь,  $\alpha$ -цепь и  $\epsilon$ -цепь соответственно. Один и тот же класс Ig также может быть разделен на разные подклассы в соответствии с отличиями в аминокислотном составе его шарнирной  
15 области, а также количеством и положением дисульфидных связей тяжелой цепи. Например, IgG может быть разделен на IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи подразделяют на  $\kappa$ -цепь или  $\lambda$ -цепь по отличию в константной области. Каждый класс Ig из пяти классов Ig может содержать либо  $\kappa$ -цепь, либо  $\lambda$ -цепь.

В настоящем изобретении переменная область легкой цепи антитела может  
20 дополнительно содержать константную область легкой цепи, и константная область легкой цепи включает каппа-, лямбда-цепь человека или мыши или их вариант.

В настоящем изобретении переменная область тяжелой цепи антитела может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, и константная область тяжелой цепи включает IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека или мыши или их вариант.

25 Последовательности из приблизительно 110 аминокислот рядом с N-концом тяжелой цепи и легкой цепи антитела значительно варьируют и представляют собой переменные области (V-области); остальная часть аминокислотной последовательности рядом с C-концом относительно стабильна и представляет собой константную область (C-область). Переменная область включает 3 гиперпеременные  
30 области (HVR) и 4 каркасные области (FR) с относительно консервативными последовательностями. Три гиперпеременные области, также известные как определяющие комплементарность области (CDR), определяют специфичность антитела. Каждая переменная область легкой цепи (VL) и переменная область тяжелой цепи (VH) состоит из 3 областей CDR и 4 областей FR, которые расположены в следующем  
35 порядке от аминоконца к карбоксильному концу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Три области CDR легкой цепи относятся к LCDR1, LCDR2 и LCDR3; три области CDR тяжелой цепи относятся к HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Количество и положение

аминокислотных остатков CDR в областях VL и VH антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению соответствуют известным правилам нумерации согласно Кабату и правилам определения согласно Кабату или ABM (<http://bioinf.org.uk/abs/>).

5 Термин "TROP-2" включает любой вариант или изоформу TROP-2, которая естественным образом экспрессируется клеткой. Антитело по настоящему изобретению может перекрестно реагировать с TROP-2 от видов, отличных от человека. В качестве альтернативы антитело может быть специфичным к TROP-2 человека и может не проявлять перекрестной реактивности с другими видами. TROP-2 или любой его вариант  
10 или изоформа могут быть выделены из клеток или тканей, в которых они экспрессируются естественным образом, или могут быть получены с помощью рекомбинантных методик с применением методик, общеизвестных в данной области и описанных в данном документе. Предпочтительно антитело к TROP-2 нацеливается на TROP-2 человека с нормальным профилем гликозилирования.

15 Термин "рекомбинантное человеческое антитело" включает человеческие антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные посредством рекомбинантных способов, при этом используемые методики и способы широко известны из уровня техники, и антитела представляют собой, например:

1. Антитела, выделенные из трансгенных трансхромосомных животных (например,  
20 мышей) с генами человеческих иммуноглобулинов или выделенные из гибридом, полученных из трансгенных трансхромосомных животных (например, мышей) с генами человеческих иммуноглобулинов.

2. Антитела, выделенные из клеток-хозяев, таких как трансфектомы, которые были трансформированы для экспрессии антител.

25 3. Антитела, выделенные из библиотек рекомбинантных комбинаторных антител человека; и

4. Антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные способами, такими как сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК.

30 Такие рекомбинантные антитела человека включают переменные области и константные области, которые используют специфические последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, кодируемые генами зародышевой линии, но также включают последующие перегруппировки и мутации, например, такие, которые возникают во время созревания антитела.

35 Термин "мышинное антитело" в настоящем изобретении относится к моноклональному антителу к TROP-2 человека, полученному в соответствии со знаниями и навыками в данной области. Получение включает введение испытуемым субъектам

антигена TROP-2, и затем выделение гибридом, экспрессирующих антитела с желательными последовательностями или функциональными свойствами. В предпочтительном воплощении настоящего изобретения мышинное антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент может дополнительно содержать константную область легкой цепи, представляющей собой мышиную каппа-цепь, лямбда-цепь или их вариант, или дополнительно содержать константную область тяжелой цепи из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 мыши или их варианта.

Термин "человеческое антитело" включает антитела, содержащие переменные и константные области последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*). Однако термин "человеческое антитело" не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих (как, например, из мыши), были привиты к человеческим каркасным последовательностям (т. е. "гуманизированные антитела").

Термин "гуманизированное антитело", также известный как антитело с привитой CDR, относится к антителам, полученным посредством прививания последовательностей CDR мыши в каркас переменной области человеческого антитела. Гуманизированные антитела способны преодолеть недостатки химерных антител, которые вызывают сильный иммунный ответ за счет переноса большого количества мышинных белковых компонентов. Для того, чтобы избежать снижения активности при одновременном снижении иммуногенности, в переменной области человеческого антитела могут быть выполнены минимальные обратные мутации для поддержания активности.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, образованному посредством слияния переменной области мышинного антитела с константной областью человеческого антитела, что может снижать иммунный ответ, индуцированный мышинным антителом. Для создания химерных антител необходимо разработать гибридомы, которые секретируют специфичные мышинные моноклональные антитела, затем клонировать гены переменной области из клеток мышинной гибридомы и затем при необходимости клонировать гены константной области человеческих антител и связать гены мышинной переменной области с геном человеческой константной области с образованием химерного гена, и затем вставить химерный ген в вектор для экспрессии человеческих последовательностей и, наконец, экспрессировать молекулу химерного антитела в эукариотической промышленной системе или прокариотической промышленной системе. Константная область человеческого антитела может быть

выбрана из группы, состоящей из константной области тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека или ее варианта, предпочтительно содержит константную область тяжелой цепи IgG1, IgG2 или IgG4 человека или константную область тяжелой цепи IgG1 с аминокислотными мутациями для усиления ADCC-токсичности (от англ. anti-dependent cell-mediated cytotoxicity - антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность).

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к антигенсвязывающему фрагменту антитела и аналогу антитела, который, как правило, включает в себя по меньшей мере часть антигенсвязывающей области или вариабельной области (например, одну или несколько CDR) исходного антитела. Фрагмент антитела в по меньшей мере некоторой степени сохраняет специфичность связывания исходного антитела. Обычно фрагмент антитела сохраняет по меньшей мере 10% связывающей активности исходного антитела, если активность выражена в пересчете на молярную концентрацию. Предпочтительно фрагмент антитела сохраняет по меньшей мере 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% или больше аффинности связывания исходного антитела с мишенью. Примеры антигенсвязывающего фрагмента включают: Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>-, Fv-фрагмент, линейное антитело, одноцепочечное антитело, наноантитело, доменное антитело и мультиспецифичное антитело, но не ограничиваются ими. Варианты сконструированных антител рассмотрены в Holliger and Hudson, 2005, Nat. Biotechnol. 23: 1126-1136.

Термин "Fab-фрагмент" состоит из одной легкой цепи и CH1 и вариабельной области одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с тяжелой цепью другой молекулы.

Термин "Fc-область" включает два фрагмента тяжелой цепи, содержащих домены антитела CH2 и CH3. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и за счет гидрофобных взаимодействий доменов CH3.

Термин "Fab'-фрагмент" включает одну легкую цепь и часть тяжелой цепи, которая содержит домен VH и домен CH1, а также область между доменами CH1 и CH2, в результате чего между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов может быть образована межцепочечная дисульфидная связь с образованием молекулы F(ab')<sub>2</sub>.

Термин "F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент" включает две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами CH1 и CH2, в результате чего между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь. Следовательно, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент состоит из двух Fab'-фрагментов, удерживаемых вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями.

Термин "Fv-область" включает вариабельные области как тяжелой, так и легкой цепей, но не содержит константных областей.

Термин "мультиспецифичное антитело" используют в наиболее широком смысле для охвата антител с полиэпитопной специфичностью. Такие мультиспецифичные антитела включают: антитела, содержащие переменную область (VH) тяжелой цепи и переменную область (VL) легкой цепи, где единица VH-VL обладает полиэпитопной специфичностью; антитела с двумя или более областями VL и VH, причем каждая единица VH-VL связывается с отдельной мишенью или отдельным эпитопом одной и той же мишени; антитела с двумя или более одиночными переменными областями, причем каждая одиночная переменная область связывается с отдельной мишенью или с отдельным эпитопом одной и той же мишени; полноразмерные антитела, фрагменты антител, диантитела, биспецифичные диантитела и триантитела, фрагменты антител, которые ковалентно или нековалентно связаны друг с другом, и т. д., но не ограничиваются ими.

Термин "одноцепочечное антитело" представляет собой одноцепочечный рекомбинантный белок, состоящий из переменной области (VH) тяжелой цепи и переменной области (VL) легкой цепи антитела, соединенных посредством связывающего пептида, и представляет собой наименьший фрагмент антитела с полным антигенсвязывающим сайтом.

Термин "фрагмент доменного антитела" представляет собой фрагмент иммуноглобулина с иммунологической функцией, который содержит только переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи. В некоторых случаях две или более областей VH ковалентно связаны с пептидным линкером с образованием двухвалентного фрагмента доменного антитела. Две области VH двухвалентного фрагмента доменного антитела могут нацеливаться на один и тот же или разные антигены.

Термин "связывается с TROP-2" относится к способности взаимодействовать с TROP-2 человека.

Термин "антигенсвязывающий сайт" относится к трехмерному сайту, распознаваемому антителом или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению.

Термин "эпитоп" относится к сайту антигена, с которым специфично связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитоп может быть образован смежными аминокислотами или аминокислотами, отличными от смежных, которые расположены рядом за счет укладки белка в третичную структуру. Эпитоп, образованный смежными аминокислотами, как правило, сохраняется после воздействия денатурирующих растворителей, тогда как эпитоп, образованный за счет укладки в третичную структуру, как правило, не сохраняется после обработки денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3-15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какой эпитоп связывается с данным

антителом, широко известны из уровня техники и включают иммуноблоттинг, анализы иммунопреципитации и т. д. Способы определения пространственной конформации эпитопа включают методики из уровня техники и методики, описанные в данном документе, такие как рентгеноструктурная кристаллография и двухмерный ядерный магнитный резонанс.

5  
10  
15  
20  
25

Термины "специфичное связывание" и "селективное связывание" относятся к связыванию антитела с эпитопом на предварительно определенном антигене. Как правило, если определение проводят посредством методики поверхностного плазмонного резонанса (SPR – от англ. surface plasmon resonanc) с использованием TROP-2 человека в качестве аналита и антитела в качестве лиганда на приборе, антитело связывается с предварительно определенным антигеном при равновесной константе диссоциации ( $K_D$ ), составляющей приблизительно менее  $10^{-7}$  М или даже меньше, и аффинность связывания антитела с предварительно определенным антигеном в по меньшей мере два раза превышает аффинность связывания антитела с неспецифичным антигеном (таким как BSA), отличным от предварительно определенного антигена или близкородственного антигена. Термин "антитело, которое распознает антиген" используют взаимозаменяемо в данном документе с термином "антитело, которое специфично связывается с антигеном".

30  
35

Термин "перекрестная реактивность" относится к способности антитела по настоящему изобретению связываться с TROP-2 разных видов. Например, антитело по настоящему изобретению, которое связывается с TROP-2 человека, также может связываться с TROP-2 другого вида. Перекрестную реактивность измеряют посредством выявления специфичной реактивности с очищенным антигеном в анализах связывания, таких как SPR и ELISA (от англ. enzyme-linked immunosorbent assay - твердофазный иммуноферментный анализ), или связывания или функционального взаимодействия с клетками, физиологически экспрессирующими TROP-2. Способы определения перекрестной реактивности включают стандартные анализы связывания, описанные в данном документе, такие как анализ посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или проточная цитометрия.

30  
35

Термины "подавлять" или "блокировать" используют взаимозаменяемо, и они охватывают как частичное, так и полное подавление/блокирование. Подавление/блокирование лиганда предпочтительно снижает или изменяет нормальный уровень или тип активности, как это возникало бы, если бы связывание лиганда происходило без подавления или блокирования. Также предполагается, что подавление и блокирование включают любое измеримое снижение аффинности связывания лиганда при приведении в контакт с антителом к TROP-2, по сравнению с лигандом, который не приводят в контакт с антителом к TROP-2.

Термин "подавление роста" (например, относящийся к клетке) предназначен для включения любого измеримого снижения роста клеток.

5 Термины "индуцирование иммунного ответа" и "усиление иммунного ответа" используют взаимозаменяемо, и они относятся к стимуляции иммунного ответа на конкретный антиген (т. е. к пассивному или адаптивному). Термин "индуцирование" по отношению к индуцированию CDC (от англ. complement-dependent cytotoxicity - комплемент-зависимая цитотоксичность) или ADCC относится к стимуляции специфических механизмов прямого цитолиза.

10 Термин "ADCC" обозначает антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность, которая означает, что клетки, экспрессирующие рецепторы Fc, непосредственно уничтожают покрытые антителом клетки-мишени посредством распознавания Fc-сегмента антитела. Эффекторная функция ADCC антитела может быть усилена или снижена, уменьшена или устранена посредством модификации Fc-сегмента IgG. Модификация относится к мутации в константной области тяжелой цепи антитела.

15 Способы получения и очистки антител и антигенсвязывающих фрагментов широко известны из уровня техники и могут быть найдены в, например, Cold Spring Harbor's Antibody Experimentation Technical Guide, Chapters 5-8 and 15. Например, мыши могут быть иммунизированы посредством TROP-2 человека или его фрагмента, и полученное антитело может быть подвергнуто ренатурированию и очистке, а также секвенированию аминокислот с применением общепринятых методик. Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть получены с применением общепринятых методик. В антителе или антигенсвязывающем фрагменте, описанном в настоящем изобретении, посредством методики генной инженерии одну или несколько человеческих FR-областей добавляют к области CDR, полученной из организма, отличного от человека. Последовательность FR зародышевой линии человека может быть найдена на веб-сайте ImMunoGeneTics (IMGT) по адресу <http://imgt.cines.fr> или в Journal of Immunoglobulin, 2001 ISBN 012441351.

30 Сконструированные антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут быть получены и очищены с применением общепринятых способов. Последовательность кДНК соответствующего антитела может быть клонирована и рекомбинирована в вектор экспрессии GS. Вектором для экспрессии рекомбинантного иммуноглобулина можно стабильно трансфицировать клетки CHO. В качестве более рекомендуемого предшествующего уровня техники системы для экспрессии млекопитающих обеспечивают гликозилирование антитела, в частности, на высококонсервативном N-конце области FC. Стабильные клоны получают посредством экспрессии антител, специфично связывающихся с человеческими антигенами. Позитивные клоны подвергали размножению в культуре в бессывороточной среде в биореакторе для получения антител. Культуральная жидкость, содержащая



секретируемые антитела, может быть очищена и собрана с применением традиционных методик. Антитела могут быть отфильтрованы и концентрированы с применением общепринятых способов. Растворимые смеси и полимеры также могут быть удалены посредством общепринятых способов, таких как молекулярные сита и ионный обмен.

- 5 Полученный продукт необходимо немедленно подвергнуть заморозке, например при -70°C, или лиофилизировать.

Антитела по настоящему изобретению относятся к моноклональным антителам. Моноклональное антитело (mAb), описанное в настоящем изобретении, относится к антителу, полученному из клеточной линии из одного клона. Линия клеток не  
10 ограничивается эукариотическими, прокариотическими или фаговыми клональными клеточными линиями. Моноклональные антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены рекомбинантным путем с применением гибридной технологии, рекомбинантной технологии, технологии фагового дисплея, синтетической технологии (такой как прививание CDR) или других существующих технологий.

15 Термины "вводить," "назначать" и "обработать", при использовании по отношению к животным, людям, экспериментальным субъектам, клеткам, тканям, органам или биологическим жидкостям, относятся к приведению в контакт экзогенных лекарственных средств, терапевтических средств, диагностических средств или композиций с животными, людьми, субъектами, клетками, тканями, органами или  
20 биологическими жидкостями. "Вводить", "назначать" и "обработать" может относиться к, например, терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским и экспериментальным процедурам. Обработка клеток включает приведение реагентов в контакт с клетками и приведение реагентов в контакт с жидкостями, при этом жидкости находятся в контакте с клетками. "Вводить", "назначать" и  
25 "обработать" также означает обработку *in vitro* и *ex vivo*, например, клетки реагентом, диагностической композицией или связывающей композицией или другой клеткой. "Лечить", при применении в отношении людей, ветеринарных субъектов или субъектов исследований, относится к терапевтическому лечению, предупреждению или профилактическим мерам, а также к исследовательским и диагностическим вариантам  
30 применения.

Термин "лечить" означает назначение терапевтического средства для внутреннего или местного применения, например содержащего любое антитело по настоящему изобретению, пациенту, у которого имеется один или более симптомов заболевания, в отношении которого известно, что терапевтическое средство оказывает терапевтический  
35 эффект. Как правило, терапевтическое средство вводят в количестве, эффективном для облегчения одного или более симптомов заболевания у подвергаемых лечению пациентов или популяции пациентов, либо посредством индуцирования регресса таких

симптомов, либо посредством подавления прогрессирования таких симптомов до любой клинически измеримой степени. Количество терапевтического средства, которое эффективно облегчает симптомы любого конкретного заболевания (также называемое "терапевтически эффективным количеством") может варьировать в зависимости от множества факторов, таких как течение заболевания, возраст и вес пациента, а также способность лекарственного средства оказывать желательный терапевтический эффект у пациента. То, были ли облегчены симптомы заболевания, может быть оценено с помощью любого способа клинического испытания, обычно используемого лечащими врачами или другими специалистами в области медицины, для оценки тяжести или прогрессирования симптомов. Несмотря на то, что воплощения настоящего изобретения (например, виды лечения или изделия) могут быть неэффективны в облегчении симптомов целевого заболевания у каждого пациента, в соответствии с любым статистическим критерием, известным из уровня техники, таким как t-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, U-критерий Манна-Уитни, критерий Краскела-Уоллиса (H-критерий), критерий Джонкхиера-Терпстра и критерий Уилкоксона, симптомы целевого заболевания должны облегчаться у статистически значимого количества пациентов.

Как использовано по всему объему описания изобретения и формулы изобретения, выражение "по сути состоящий из" или его варианты подразумевает включение всех заявленных элементов или групп элементов и необязательно других элементов, аналогичных или отличающихся по природе от заявленных элементов, причем другие элементы в значительной степени не изменяют основные свойства или новые свойства указанных схемы лечения, способа или композиции.

Термин "встречающийся в природе" применительно к объекту в данном документе относится к тому факту, что объект встречается в природе. Например, полипептидная последовательность или полинуклеотидная последовательность, существующая в организмах (включая вирусы), которую можно выделить из природных источников и которая не подвергалась преднамеренной искусственной модификации в лаборатории, является встречающейся в природе.

Термин "эффективное количество" включает количество, достаточное для облегчения или предотвращения симптомов медицинского состояния или патологического состояния. Эффективное количество также означает количество, достаточное для того, чтобы обеспечить или облегчить диагностику. Эффективное количество для конкретного пациента или субъекта ветеринарии может варьировать в зависимости от следующих факторов: например, состояния, подлежащего лечению, общего состояния здоровья пациента, способа, пути введения и дозировки, а также тяжести побочных эффектов. Эффективное количество может представлять собой

максимальную дозировку или схему дозирования, которая позволяет избежать значительных побочных эффектов или токсических эффектов.

Термин "экзогенный" относится к веществам, которые продуцируются вне организмов, клеток или организма человека, в зависимости от контекста.

5 Термин "эндогенный" относится к веществам, которые продуцируются в клетках, организмах или организме человека, в зависимости от контекста.

Термин "гомологичный" относится к сходству последовательностей между двумя полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидами. Если положение в двух сравниваемых последовательностях занято одной и той же мономерной субъединицей, представляющей собой основание или аминокислоту, например каждое положение в двух молекулах ДНК занято аденином, тогда молекулы являются гомологичными в этом положении. Процент гомологии между двумя последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для данных двух последовательностей, разделенного на количество сравниваемых положений  $\times 100\%$ . Например, когда последовательности оптимально выровнены, если 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают или гомологичны, то данные две последовательности гомологичны на 60%. Обычно сравнения выполняются в том случае, если выравнивание двух последовательностей дает наибольший процент гомологии.

20 Термины "клетка", "клеточная линия" и "культура клеток" используются как взаимозаменяемые, и все такие обозначения включают их потомство. Таким образом, слова "трансформант" и "трансформированная клетка" включают первичные клетки субъекта и культуры, полученные из них, независимо от количества переносов. Также следует понимать низкую вероятность того, что все потомки будут полностью  
25 одинаковыми по содержанию ДНК из-за преднамеренных или непреднамеренных мутаций. Включены мутантные потомки, которые обладают той же функцией или биологической активностью, как и при скрининге в исходно трансформированных клетках. "Необязательный" или "необязательно" означает, что событие или обстоятельство, описанные далее, может произойти, но не обязательно произойдет, и данное описание  
30 включает случаи, в которых события или обстоятельства происходят или не происходят. Например, "необязательно содержащий 1-3 переменных области тяжелой цепи антитела" означает, что переменная область тяжелой цепи антитела со специфической последовательностью может присутствовать, но необязательно.

Термин "фармацевтическая композиция" означает композицию, содержащую одно  
35 или несколько антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, и другие ингредиенты, такие как физиологически/фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества. Назначение фармацевтических

композиций состоит в том, чтобы облегчить введение живым организмам и облегчить всасывание активных ингредиентов с тем, чтобы проявить биологическую активность.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, которая является безопасной и эффективной при использовании у млекопитающих и обладает надлежащей биологической активностью. Конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну аминокислотную группу и, следовательно, может образовывать соль с кислотой. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых солей включают: гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, сульфат, дисульфат, цитрат, ацетат, сукцинат, аскорбат, оксалат, нитрат, фосфат, гидрофосфат, первичный кислый фосфат, салицилат, гидроцитрат, тартрат, малеат, фумарат, формиат, бензоат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат и *p*-толуолсульфонат.

Термин "сольватное соединение" означает, что соединение, представляющее собой конъюгат антитело-лекарственное средство, по настоящему изобретению образует фармацевтически приемлемое сольватное соединение с одной или несколькими молекулами растворителя, и неограничивающие примеры молекул растворителя включают воду, этанол, ацетонитрил, изопропиловый спирт и этилацетат.

В контексте настоящего изобретения, термин "цитотоксическое лекарственное средство" относится к веществу, которое подавляет функцию клетки и/или вызывает гибель или разрушение клетки.

Термин "ингибитор тубулина" относится к классу соединений, которые препятствуют процессу митоза клеток посредством подавления полимеризации тубулина или активации агрегации тубулина, оказывая тем самым противоопухолевые эффекты. Неограничивающие примеры включают: майтансиноиды, калихеамицины, таксаны, винкристин, колхицин, доластатин/ауристатин/монометил ауристатин E (MMAE)/монометил ауристатин F(MMAF).

Термин "линкер" относится к химической конструкции, содержащей ковалентную связь или цепочку атомов, которая ковалентно присоединяет антитело к лекарственному средству. Неограничивающие примеры линкеров включают: арилен, гетероарилен, PEG (от англ. polyethyleneglycol – полиэтиленгликоль), полиметиленокси, сукцинат, сукцинамид, дигликолят, малонат и капроамид.

Термин "нагрузка лекарственным средством" (также относящийся к соотношению лекарственного средства и антитела (DAR – от англ. drug-to-antibody ratio)) представлен буквой *u*, представляющей собой среднее количество цитотоксических лекарственных средств на антитело в общей формуле (A). Нагрузка лекарственным средством в настоящем изобретении может находиться в диапазоне от 1 до 20 цитотоксических

лекарственных средств (D) на антитело. Конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (A) представляет собой совокупность антител, конъюгированных с определенным количественным диапазоном (1-20) цитотоксических лекарственных средств. Нагрузка лекарственным средством (DAR) в конъюгате антитело-лекарственное средство, полученная в результате реакции конъюгации, может быть охарактеризована традиционными средствами, такими как масс-спектрометрия, ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) и ELISA. С помощью этих средств может быть определено количественное распределение конъюгатов антитело-лекарственное средство по значениям  $u$ .

Настоящее изобретение дополнительно включает различные дейтерированные формы соединения формулы (I). Каждый доступный атом водорода, присоединенный к атому углерода, может быть независимо заменен атомом дейтерия. Специалисты в данной области техники могут синтезировать дейтерированные формы соединения формулы (I), обратившись к соответствующей литературе. Дейтерированные формы соединения формулы (I) могут быть получены с использованием коммерчески доступных дейтерированных исходных материалов или могут быть синтезированы с использованием дейтерированных реагентов с использованием традиционных методик. Дейтерированные реагенты включают без ограничения дейтерированный боран, раствор тридейтерированного борана в тетрагидрофуране, дейтерированный алюмогидрид лития, дейтерированный йодэтан и дейтерированный йодметан.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения цитотоксическое лекарственное средство конъюгировано с N-концевой аминогруппой и/или эpsilon-аминогруппой остатка лизина лиганда посредством связывающей единицы. В других воплощениях настоящего изобретения цитотоксическое лекарственное средство конъюгировано с сульфгидрильной группой лиганда посредством связывающей единицы. Как правило, количество молекул лекарственного средства, которые могут быть конъюгированы с антителом в реакции конъюгации, будет меньше теоретического максимума.

Следующие неограничивающие способы могут быть использованы для контроля нагрузки конъюгата лиганд-цитотоксическое лекарственное средство и включают:

(1) контроль молярного соотношения связывающего реагента и моноклонального антитела,

(2) контроль времени реакции и температуры,

(3) выбор различных реагентов для реакции.

Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по настоящему изобретению обладает значительным противоопухолевым эффектом и надлежащей безопасностью.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 представлен  $^1\text{H}$ -ЯМР (ядерный магнитный резонанс)-спектр соединения D.

5

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следующие примеры используются для дополнительного описания настоящего изобретения, однако эти примеры не ограничивают объем настоящего изобретения. Экспериментальные способы без указания конкретных условий в примерах настоящего изобретения обычно выполняют в соответствии со стандартными условиями, такими как изложенные в Руководстве по экспериментам с использованием технологии антител и Руководстве по молекулярному клонированию Cold Spring Harbor; или выполняют в соответствии с условиями, рекомендуемыми для исходного материала или изготовителем продукта. Реагенты, для которых конкретный источник не указан, являются стандартными имеющимися в продаже реагентами.

15

### Пример 1. Эксперимент по конструированию варианта HU6DL

Последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированного антитела HU6DL, раскрытые в патенте WO 2020228604, показаны в таблице 1 ниже. Ввиду наличия мотива  $\text{N}^{54}\text{D}^{55}\text{S}^{56}$  в HCDR2 гликозилирование происходит без затруднений.

20

Таблица 1. Последовательности CDR переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированного антитела HU6DL

Название	Последовательность	Номер
HCDR1	NYWMMN	SEQ ID NO: 3
HCDR2	RIDPNDSETHYNQKFKD	SEQ ID NO: 4
HCDR3	SGFGSTYWFFDV	SEQ ID NO: 5
LCDR1	KASQDVSTAVA	SEQ ID NO: 6
LCDR2	SASYRYT	SEQ ID NO: 7
LCDR3	QQHYSTPLT	SEQ ID NO: 8

Мутантные варианты HU6DL.R54, HU6DL.Y54, HU6DL.Q54, HU6DL.L54HU6DL.T54, HU6DL.I54, HU6DL.F54, HU6DL.E54 и HU6DL.A54 антитела HU6DL получали путем сайт-направленной мутации N54 с применением компьютеризованной технологии, которая обеспечивала снижение потенциального риска гликозилирования, не оказывая влияния на его связывание с антигеном и его собственную термостабильность. Последовательность HCDR2 соответствующей тяжелой цепи являлась такой, как показано далее.

25

30

Таблица 2. Последовательности HCDR2 варибельной области тяжелой цепи мутантов HU6DL

Название	Последовательность	Номер
HU6DL.R54	RIDPRDSETHYNQKFKD	SEQ ID NO: 9
HU6DL.Y54	RIDPYDSETHYNQKFKD	SEQ ID NO: 10
HU6DL.Q54	RIDPQDSETHYNQKFKD	SEQ ID NO: 11
HU6DL.L54	RIDPLDSETHYNQKFKD	SEQ ID NO: 12
HU6DL.T54	RIDPTDSETHYNQKFKD	SEQ ID NO: 13
HU6DL.I54	RIDPIDSETHYNQKFKD	SEQ ID NO: 14
HU6DL.F54	RIDPFDSETHYNQKFKD	SEQ ID NO: 15
HU6DL.E54	RIDPEDSETHYNQKFKD	SEQ ID NO: 16
HU6DL.A54	RIDPADSETHYNQKFKD	SEQ ID NO: 17

Ниже представлены соответствующие варибельные области тяжелой цепи и

5 легкой цепи.

HCVR HU6DL.R54

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPRDSETHY  
NPKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 18

10 LCVR HU6DL.R54

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYISASYRYTGVPSTRFS  
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTTRLEIK

SEQ ID NO: 19

HCVR HU6DL.Y54

15 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPYDSETHYN  
QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 20

LCVR HU6DL.Y54

20 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYISASYRYTGVPSTRFS  
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTTRLEIK

SEQ ID NO: 19

HCVR HU6DL.Q54

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPQDSETHY  
NPKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVGQGTTVTVSS

25 SEQ ID NO: 21

LCVR HU6DL.Q54

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYISASYRYTGVPSTRFS  
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTTRLEIK

SEQ ID NO: 19

HCVR HU6DL.L54

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPLDSETHYN  
QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 22

5 LCVR HU6DL.L54

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYYSASYRYTGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 19

HCVR HU6DL.T54

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPTDSETHYN  
QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 23

LCVR HU6DL.T54

15 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYYSASYRYTGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 19

HCVR HU6DL.I54

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPIDSETHYN  
QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVWGQGTTVTVSS

20 SEQ ID NO: 24

LCVR HU6DL.I54

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYYSASYRYTGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 19

25 HCVR HU6DL.F54

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPFDSETHYN  
QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 25

LCVR HU6DL.F54

30 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYYSASYRYTGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 19

HCVR HU6DL.E54

35 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPEDSETHYN  
QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 26

LCVR HU6DL.E54



DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYISASYRYTGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 19

HCVR HU6DL.A54

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPADSETHYN  
QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 27

LCVR HU6DL.A54

10 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYISASYRYTGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 19

Сконструированные последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи присоединены к последовательностям константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи IgG1 соответственно. Присоединенная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 человека представляла собой следующую:

C1 IgG1

20 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY  
SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP  
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT  
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALTH  
NHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 1

25 Присоединенная последовательность константной области человеческой каппа-цепи представляла собой следующую:

С каппа-цепи Ig

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD  
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30 SEQ ID NO: 2

После присоединения полученные в результате иллюстративные последовательности тяжелой и легкой цепей представляли собой следующее:

HC HU6DL.R54

35 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPRDSETHY  
NQKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVWGQGTTVTVSSA  
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP

KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN  
HYTQKSLSLSPGK

5 SEQ ID NO: 28

LC HU6DL.R54

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYISASYRYTGVPFRFS  
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV

10 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 29

HC HU6DL.Y54

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPYDSETHYN  
QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVGWGQGTITVTVSSAST  
15 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSL

SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK  
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY

20 TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 30

LC HU6DL.Y54

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYISASYRYTGVPFRFS  
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
25 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV

YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 29

HC HU6DL.Q54

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPQDSETHY  
30 NQKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVGWGQGTITVTVSSA  
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLY

LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF

35 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN  
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 31

LC HU6DL.Q54

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYISASYRYTGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
TASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV  
5 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 29

HC HU6DL.L54

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPLDSETHYN  
QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVWGQTTVTVSSAST  
10 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPQAVLQSSGLYSLS  
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK  
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP  
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY  
15 TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 32

LC HU6DL.L54

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYISASYRYTGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
20 TASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV  
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 29

HC HU6DL.T54

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPTDSETHYN  
25 QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVWGQTTVTVSSAST  
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPQAVLQSSGLYSLS  
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK  
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP  
30 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY  
TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 33

LC HU6DL.T54

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYISASYRYTGVPSRFS  
35 GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
TASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV  
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

HC HU6DL.I54

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPIDSETHYN  
 QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVWGQGTTVTVSSAST  
 5 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS  
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP  
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY  
 10 TQKSLSLSPGK

LC HU6DL.I54

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYYSASYRYTGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
 15 TASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV  
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

HC HU6DL.F54

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPFDSETHYN  
 20 QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVWGQGTTVTVSSAST  
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS  
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP  
 25 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY  
 TQKSLSLSPGK

LC HU6DL.F54

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYYSASYRYTGVPSRFS  
 30 GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
 TASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV  
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

HC HU6DL.E54

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWVRQAPGKGLEWMGRIDPEDSETHYN  
 35 QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVWGQGTTVTVSSAST  
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS

SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
 KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP  
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY  
 5 TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 36

LC HU6DL.E54

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYISASYRYTGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
 10 TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV  
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 29

HC HU6DL.A54

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYWMNWRQAPGKGLEWMGRIDPADSETHYN  
 15 QKFKDRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGFGSTYWFFDVGQGTITVSSAST  
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
 KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP  
 20 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY  
 TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 37

LC HU6DL.A54

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLFYISASYRYTGVPSRFS  
 25 GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
 TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV  
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 29

30 Синтезировали фрагменты ДНК на основе аминокислотных последовательностей  
 легкой и тяжелой цепей каждого гуманизованного антитела, указанного выше, и  
 мутанты белка HU6DL экспрессировали посредством временной трансфекции клеток  
 HEK293, а чистоту антитела выявляли посредством молекулярной эксклюзионной  
 хроматографии. Концентрация и чистота показаны в таблице 3 ниже.

Таблица 3. Концентрация и чистота мутантов HU6DL

Название	Концентрация (мг/мл)	Чистота (%)
HU6DL.R54	1,99	95,8
HU6DL.Y54	1,34	96,4
HU6DL.Q54	1,73	93,1
HU6DL.L54	1,36	94,9
HU6DL.T54	2,73	96,1
HU6DL.I54	2,00	95,5
HU6DL.F54	1,68	93,5
HU6DL.E54	1,56	95,6
HU6DL.A54	1,00	95,1

### Пример 2. Эксперимент по оценке аффинности мутантов HU6DL по отношению к антигену Trop-2

5

#### Цель эксперимента

Метод сэндвич-ELISA, а именно "антиген-антитело-HRP-меченное вторичное антитело", использовали для оценки различий в уровнях аффинности разных мутантов антитела к Trop-2 по отношению к антигену Trop-2.

10

#### Стадии эксперимента

Белок Trop-2 (с гистидиновой меткой) (SinoBiologics, кат. № 10428-H08H) разбавляли до 1 мкг/мл с использованием DPBS с pH 7,4, и разбавленный раствор добавляли в 96-луночный планшет с высокой аффинностью (Corning, кат. № 3590) в количестве 100 мкл/лунка, и смесь инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующий день раствор антигена Trop-2 центрифугировали, и добавляли раствор, содержащий 0,05% Tween 20 в PBS (от англ. Phosphate buffered saline - фосфатно-солевой буферный раствор) с pH 7,4 (PBST), в количестве 200 мкл/лунка, 3 раза выполняли промывку, а затем добавляли 2% BSA (от англ. bovine serum albumine - бычий сывороточный альбумин) (растворенный в PBST) в количестве 200 мкл/лунка, блокирование выполняли при 37°C в течение 1 ч и использовали PBST для промывки, выполняемой 3 раза. Кандидатное антитело, подвергается 10-кратному серийному разведению для получения 8 градиентов концентрации (исходная концентрация составляла  $10 \text{ нМ} - 1 \times 10^{-6} \text{ нМ}$ ), добавляли в количестве 100 мкл/лунка, 0,5% BSA использовали в качестве отрицательного контроля, блокирование выполняли при 37°C в течение 1 ч и PBST использовали для промывки, выполняемой 3 раза. Раствор вторичного антитела козы, меченного HRP (от англ. horseradish peroxidase - пероксидаза хрена), к Fc человеческого IgG (Abcam, кат. № ab97225), разбавленного в соотношении 1: 10000, добавляли в

25

количестве 100 мкл/лунка, блокирование выполняли при 37°C в течение 1 ч и PBST использовали для промывки, выполняемой 3 раза.

Добавляли субстрат, представляющий собой TMB (от англ. tetramethylbenzidine - тетраметилбензидин) (CST, кат. № 7004P6), в количестве 100 мкл/лунка и обеспечивали прохождение реакции в смеси при комнатной температуре в течение 3 мин до тех пор, пока цвет лунки, содержащей раствор с самой высокой концентрацией антитела, не становился темно-синим. Раствор для остановки реакции (CST, кат. № 7002P6) добавляли в количестве 50 мкл/лунка для остановки реакции, и поглощение (OD (от англ. optical density – оптическая плотность)) считывали при 450 нм.

#### Обработка данных

Значение  $EC_{50}$  применительно к аффинности каждого мутанта HU6DL по отношению к антигену рассчитывали посредством имеющейся в GraphPad PRISM 8.0 формулы для расчета переменного углового коэффициента кривой зависимости  $\log(\text{агонист})$  от величины ответа (четыре параметра), задавая логарифмическое значение концентрации кандидатного антитела в качестве координаты по оси X, а значение поглощения OD450 – в качестве ординаты. Аффинность мутантов HU6DL по отношению к антигену, представленному TROP-2 человека ( $EC_{50}$ ), показана в таблице 4 ниже.

Таблица 4. Аффинность мутантов HU6DL по отношению к антигену, представленному TROP-2 человека ( $EC_{50}$ )

Название	Наилучший показатель OD450	Аффинность $EC_{50}$ (нМ)
HU6DL.R54	2,05	0,052
HU6DL.Y54	1,93	0,051
HU6DL.Q54	1,91	0,086
HU6DL.L54	1,96	0,048
HU6DL.T54	1,90	0,052
HU6DL.I54	1,96	0,063
HU6DL.F54	1,93	0,067
HU6DL.E54	1,96	0,064
HU6DL.A54	2,07	0,062

#### Заключение по результатам эксперимента

Вышеприведенные данные показали, что мутанты HU6DL по настоящему изобретению обладали высокой аффинностью по отношению к антигену, представленному TROP-2 человека.

#### Пример 3. Эксперимент по оценке аффинности мутантов HU6DL к опухолевым клеткам

## Цель эксперимента

Проточную цитометрию использовали для оценки различий в уровнях аффинности мутантов HU6DL по отношению к опухолевым клеточным линиям, экспрессирующим антиген Trop-2.

5

### Реагенты для экспериментов:

клетки рака желудка NCI-N87 (приобретены в банке клеток Академии наук Китая, TCHu130);

10 клетки немелкоклеточного рака легкого HCC827 (приобретены в банке клеток Академии наук Китая, TCHu153);

клетки рака мочевого пузыря SW780 (приобретены в банке клеток Академии наук Китая, TCHu219);

клетки рака мочевого пузыря RT4 (приобретены в банке клеток Академии наук Китая, TCHu226).

15 

### Стадии эксперимента

Раствор для расщепления, содержащий аккутазу (*Sigma, кат. № A6964*), использовали для обработки опухолевых клеток, характеризующихся надлежащим ростовым статусом, получали суспензию одиночных клеток с использованием раствора 2% FBS (от англ. Fetal Bovine Serum - фетальная телячья сыворотка) (разбавленной в DBPS, pH 7,4) и плотность клеток доводили до  $1 \times 10^6$  клеток/мл. Суспензию равномерно распределяли в 96-луночном планшете с V-образным дном лунок в количестве 100 мкл/лунка, центрифугировали при 4°C при 300 g × 5 мин и супернатант удаляли. Растворы кандидатного антитела, подвергнутого 10-кратному серийному разведению для получения 10 градиентов концентрации ( $1000 \text{ нМ} \cdot 1 \times 10^{-6} \text{ нМ}$ ), добавляли в количестве 25 100 мкл/лунка и смесь инкубировали при 4°C в течение 1 ч,

центрифугировали при 4°C при 300 g × 5 мин и дважды промывали. Раствор меченого с помощью PE мышинового вторичного антитела к Fc IgG человека (*Biolegend, кат. № 409304*), разбавленный в соотношении 5 мкл/ $10^6$  клеток, добавляли в количестве 100 мкл/лунка, и смесь инкубировали при 4°C в течение 1 ч, центрифугировали при 4°C 30 при 300 g × 5 мин и дважды промывали. Добавляли 70 мкл раствора 2% FBS для ресуспендирования клеток, и среднюю интенсивность флуоресценции (MFI – от англ. mean fluorescent intensity) PE-канала определяли посредством проточной цитометрии с помощью ZE5 (Bio-Rad, ZE5).

### Обработка данных

35 Значение  $EC_{50}$  применительно к аффинности каждого кандидатного антитела по отношению к опухолевым клеткам рассчитывали посредством имеющейся в GraphPad PRISM 8.0 формулы для расчета переменного углового коэффициента кривой



зависимости  $\log(\text{агонист})$  от величины ответа (четыре параметра), задавая логарифмическое значение концентрации мутантного антитела в качестве координаты по оси X, а величину MFI – в качестве ординаты, как показано в таблице 5 ниже.

5 Таблица 5. Аффинность мутантов HU6DL по отношению к опухолевым клеткам NCI-N87, HCC827, SW780 и RT4 ( $EC_{50}$ )

Название	NCI-N87		HCC827		SW780		RT4	
	Наилучший показатель MFI	$EC_{50}$ (нМ)	Наилучший показатель MFI	$EC_{50}$ (нМ)	Наилучший показатель MFI	$EC_{50}$ (нМ)	Наилучший показатель MFI	$EC_{50}$ (нМ)
HU6DL.R 54	2693	1,12	6088	1,36	6581	1,22	3231	1,21
HU6DL.T 54	1703	2,25	4563	1,46	4850	1,20	2254	1,31

#### Заключение по результатам эксперимента

10 Вышеприведенные данные показали, что мутанты HU6DL по настоящему изобретению обладали надлежащей аффинностью по отношению к опухолевым клеткам NCI-N87, HCC827, SW780 и RT4.

#### Пример 4. Эксперимент по оценке эндоцитоза TROP2, опосредуемого мутантным HU6DL

##### 15 Цель эксперимента

Использовали проточную цитометрию для оценки эндоцитозной активности антитела, представленного мутантами HU6DL, в отношении линий опухолевых клеток, экспрессирующих антиген Trop-2.

##### Стадии эксперимента

20 Раствор для расщепления, содержащий аккутазу (*Sigma, кат. № A6964*), использовали для обработки клеток рака желудка NCI-N87 (приобретены в банке клеток Академии наук Китая, TCHu130), характеризующихся надлежащим ростовым статусом, получали суспензию одиночных клеток с использованием раствора 2% FBS (разбавленной в DBPS, pH 7,4) и плотность клеток довели до  $1 \times 10^7$  клеток/мл.

25 Суспензию равномерно распределяли в 96-луночном планшете с V-образным дном лунок в количестве 100 мкл/луночка, и раствор кандидатного антитела добавляли при конечной концентрации 20 мкг/мл, и смесь смешивали до однородного состояния, и инкубировали при 4°C в течение 1 ч,

30 и центрифугировали при 4°C при  $300 g \times 5$  мин. Раствор меченного с помощью PE мышиного вторичного антитела к Fc IgG человека (*Biolegend, кат. № 409304*),

разбавленный в соотношении 5 мкл/10<sup>6</sup> клеток, добавляли в количестве 100 мкл/лунка, и смесь инкубировали при 4°C в течение 1 ч,

центрифугировали при 4°C при 300 g × 5 мин и дважды промывали. 1 мл предварительно нагретой полной культуральной среды использовали для ресуспендирования клеточного осадка, и полученную суспензию разделяли на четыре равные части, которые обозначали как группа, соответствующая 0 мин, холостая контрольная группа, группа, соответствующая 30 мин, и группа, соответствующая 120 мин, соответственно. Отбирали группу, соответствующую 0 мин, и холостую контрольную группу и помещали их на лед. Остальное помещали в инкубатор при 37°C для обеспечения прохождения эндоцитоза на 30 мин и 120 мин, соответственно. Соответствующие группы извлекали в соответствующие моменты времени и помещали на лед для предварительного охлаждения в течение 5 мин. Все группы с обработкой центрифугировали, и супернатант (4°C, 1500 об/мин × 5 мин) отбрасывали, буфер для FACS (от англ. Fluorescence-Activated Cell Sorting - сортировка клеток с активированной флуоресценцией) использовали для промывки, осуществляемой один раз, и супернатант отбрасывали. 250 мкл диссоциирующего буфера добавляли ко всем группам с обработкой, за исключением группы, соответствующей 0 мин, смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 8 мин и центрифугировали (4°C, 1500 об/мин × 5 мин), а супернатант отбрасывали. Буфер для FACS использовали для промывки, выполняемой два раза, и супернатант удаляли. К каждой группе образцов добавляли 80 мкл 2% FBS для ресуспендирования клеток, и сигналы флуоресценции образцов выявляли посредством проточной цитометрии с помощью ZE5 (Bio-Rad, ZE5).

#### Обработка данных

Эффективность эндоцитоза для каждого кандидатного антитела рассчитывали в соответствии с данной формулой: уровень опосредуемого антителом эндоцитоза в процентах (%) = (MFI группы с обработкой - MFI холостой контрольной группы)/(MFI группы, соответствующей 0 мин - MFI холостой контрольной группы) \* 100%. Степень эндоцитоза, опосредуемого мутантным HU6DL, выявляемая с применением вышеуказанного способа, показана в таблице 6 ниже.

Таблица 6. Эффективность эндоцитоза, опосредуемого мутантами HU6DL, на клетках NCI-N87

Название	Степень эндоцитоза для антитела (%)	
	30 мин	120 мин
HU6DL.R54	64	62
HU6DL.Y54	71	71
HU6DL.Q54	71	71

HU6DL.L54	76	72
HU6DL.T54	63	69
HU6DL.I54	65	66
HU6DL.F54	72	75
HU6DL.E54	75	72
HU6DL.A54	72	70

#### Заключение по результатам эксперимента

Вышеприведенные данные показали, что мутанты HU6DL по настоящему изобретению опосредовали надлежащий эндоцитоз белка TROP-2 у клеток рака желудка NCI-N87.

#### Пример 5. Обнаружение примесных компонентов у мутантов HU6DL

Цель эксперимента: капиллярный электрофорез использовали для определения и сравнения уровней содержания и изменения пиков, соответствующих примесям, у мутантных антител на основе метода Maurice-nrCE-SDS.

##### Стадии эксперимента

##### 1. Подготовка образца.

(1) Замена жидкости и концентрирование образца. В том случае, если концентрация белка в образце составляла менее 5 мг/мл, или концентрация соли в буфере для образца являлась высокой, для образца возникала необходимость выполнения замены жидкости и концентрирования для обеспечения того, чтобы концентрация белка составляла около 5 мг/мл, и концентрация соли в образце должна составлять менее 50 мМ.

(2) Обработка образца для CE в невозстанавливающих условиях. Образец добавляли в пробирку EP. Количество белка для каждого образца составляло 50 мкг. Добавляли 1 мкл внутреннего стандарта с молекулярной массой 10 кДа (Protein Simple, 046-144), добавляли 2,5 мкл 250 мМ IAM (от англ. iodoacetamide – йодацетамид) (Sigma, I1149-5G) и добавляли 1× буфер для образца (Protein Simple, 046-567) с получением конечного объема 50 мкл. (3) После встряхивания и смешивания до однородного состояния смесь нагревали при 70°C, инкубировали в течение 10 мин, затем извлекали, инкубировали на льду в течение 5 мин и охлаждали, а затем центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 мин. После центрифугирования 35 мкл супернатанта переносили в 96-луночный планшет для образцов, который подходит для данного прибора, а затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин. 96-луночный планшет для образцов помещали в Maurice (Protein Simple) с целью подготовки к загрузке и анализу образца.

##### 2. Обнаружение с использованием прибора

Прибор включали, и открывали программное обеспечение, и следовали стадиям эксплуатации прибора с выполнением самодиагностики прибора. Устанавливали капиллярный картридж и соответствующие реагенты готовили и размещали в соответствующих местах в приборе. В соответствии со стадиями эксплуатации прибора задавали соответствующие параметры для выполнения СЕ-анализа в невосстанавливающих условиях. Выполняли установку последовательности для образцов, соответствующую последовательность редактировали в соответствии с названием образца, а число образцов для каждой последовательности не превышало 48. После завершения редактирования последовательности нажимали на “старт” для начала выполнения обнаружения последовательности.

Следующую формулу использовали для расчета содержания главного пика в образце и содержания в образце пика, соответствующего примесям.

$$\text{Чистота при невосстанавливающих условиях (\%)} = \frac{CA_{\text{главного пика}}}{CA_{\text{общая}}} \times 100\%$$

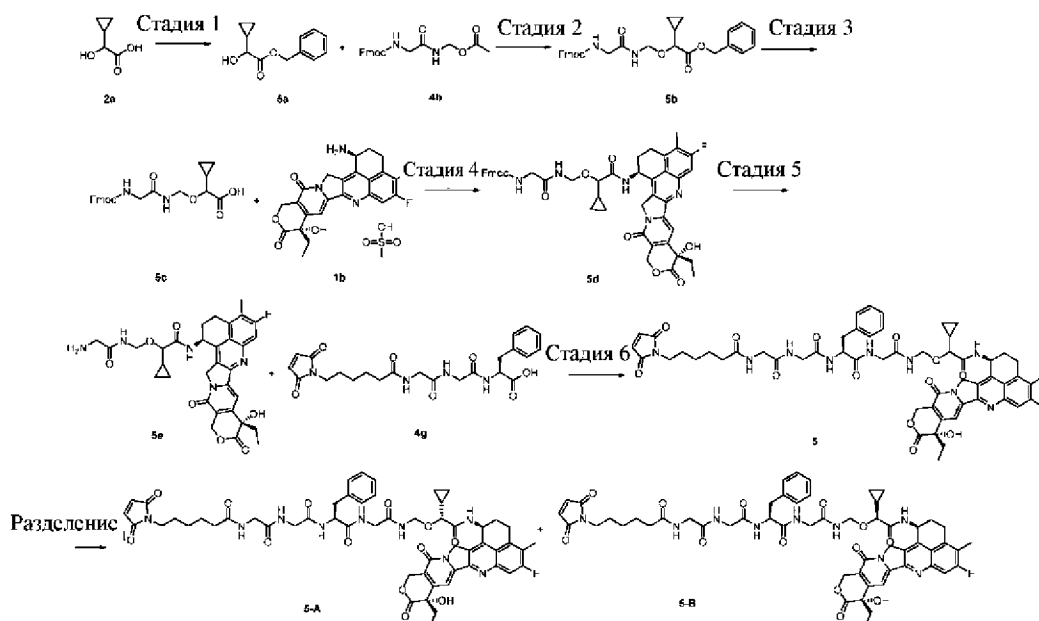
Примечания. В формуле чистота при невосстанавливающих условиях представляла собой процентное значение скорректированной площади пика применительно к главному пику;  $CA_{\text{главного пика}}$  представляла собой значение скорректированной площади пика применительно к главному пику;  $CA_{\text{общая}}$  представляла собой суммарное значение скорректированных площадей пика применительно к главному пику и пику, соответствующему примесям.

Таблица 7. Значения содержания главного пика и пика, соответствующего примесям, в мутантном HU6DL

Образец	Содержание главного пика (%)	Содержание пика, соответствующего примесям (%)
HU6DL T54	93,62	н/о

Результаты эксперимента показали, что содержание главного пика в образце HU6DL T54 достигало 93,62%, при этом наличия каких-либо примесей определено не было, и образец характеризовался очень высокой чистотой.

### Пример 6. Получение соединения 1



Стадия 1: **2a** (2 г, 17,2 ммоль) растворяли в 75 мл ацетонитрила и последовательно добавляли карбонат калия (9,27 г, 67,2 ммоль), бензилбромид (20 мл, 167,2 ммоль) и йодид тетрабутиламмония (620 мг, 1,68 ммоль). Реакционную жидкость перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч, фильтровали через диатомовую землю и осадок на фильтре промывали с помощью этилацетата (20 мл). Объединенный фильтрат концентрировали при пониженном давлении, и полученный остаток очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле с применением проявительной системы С с получением продукта **5a** (3,2 г, выход: 90,1%).

Стадия 2: **5a** (181,3 мг, 0,879 ммоль) и **4b** (270 мг, 0,733 ммоль) добавляли в реакционную колбу, добавляли 6 мл тетрагидрофурана, три раза выполняли замену атмосферы аргоном и смесь охлаждали до 0-5°C на водяной бане со льдом; добавляли трет-бутоксид калия (164 мг, 1,46 ммоль), ледяную баню удаляли, и смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 40 мин; добавляли 15 мл ледяной воды, смесь экстрагировали с использованием этилацетата (40 мл × 2) и хлороформа (20 мл × 5) и органические фазы объединяли и концентрировали. Полученный остаток растворяли в 6 мл диоксана, добавляли 3 мл воды, добавляли бикарбонат натрия (73,8 мг, 0,879 ммоль) и 9-флуоренилметилхлорформиат (190 мг, 0,734 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Добавляли 30 мл воды, смесь экстрагировали с использованием этилацетата (20 мл × 3), органическую фазу промывали с использованием насыщенного раствора хлорида натрия (30 мл), высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле с применением проявительной системы С с

получением продукта **5b**, представляющего собой бензил-10-циклопропил-1-(9*H*-флуорен-9-ил)-3,6-диоксо-2,9-диокса-4,7-диазаундекан-11-ат (73 мг, выход: 19,4%).

МС (масс-спектрометрия) *m/z* (ИЭР (ионизация электрораспылением)): 515,0 [M+1].

5 Стадия 3: **5b** (30 мг, 0,058 ммоль) растворяли в 6,75 мл смешанного растворителя из тетрагидрофурана и этилацетата (V:V составляет 2:1) и добавляли палладий на углероде (18 мг, содержание 10%, сухой тип), три раза проводили замену атмосферы водородом и обеспечивали осуществление реакции смеси при перемешивании при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную жидкость фильтровали через диатомовую землю, осадок на фильтре промывали с помощью этилацетата и фильтрат  
10 концентрировали с получением неочищенного продукта **5c**, представляющего собой 10-циклопропил-1-(9*H*-флуорен-9-ил)-3,6-диоксо-2,9-диокса-4,7-диазаундекан-11-овую кислоту (20 мг), и продукт непосредственно использовали в следующей реакции без очистки.

МС *m/z* (ИЭР): 424,9 [M+1].

15 Стадия 4: **1b** (15 мг, 28,2 мкмоль) добавляли в реакционную колбу, добавляли 1,5 мл *N,N*-диметилформамида, три раза выполняли замену атмосферы аргоном, затем смесь охлаждали до 0-5°C на водяной бане со льдом; по каплям добавляли каплю триэтиламина, добавляли неочищенный продукт **5c** (20 мг, 47,1 мкмоль), добавляли хлорид 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолина (25,4 мг, 86,2 мкмоль) и  
20 обеспечивали прохождение реакции в смеси при перемешивании на ледяной бане в течение 40 мин. Добавляли 15 мл воды, смесь экстрагировали с использованием этилацетата (20 мл × 3) и органические фазы объединяли. Органическую фазу промывали с использованием насыщенного раствора хлорида натрия (20 мл × 2), высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали, и фильтрат  
25 концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали посредством тонкослойной хроматографии с применением проявительной системы В с получением указанного в заголовке продукта **5d**, представляющего собой (9*H*-флуорен-9-ил)метил (2-(((1-циклопропил-2-(((1*S*,9*S*)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1*H*,12*H*-бензо[*de*]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-*b*]хинолин-1-ил)амино)-2-оксоэтокси)метил)амино)-2-оксоэтил)карбамат (23,7 мг, выход: 78,9%).  
30

МС *m/z* (ИЭР): 842,1[M+1].

Стадия 5: **5d** (30 мг, 35,7 мкмоль) растворяли в 3 мл дихлорметана, добавляли 1,5 мл диэтиламина и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную жидкость концентрировали при пониженном давлении, и добавляли 1,5 мл  
35 толуола, и смесь концентрировали при пониженном давлении, что повторяли дважды. 4,5 мл *n*-гексана добавляли к остатку с получением взвеси. После отстаивания супернатант выливали, а твердое вещество оставалось. Остаток в виде твердого

вещества концентрировали при пониженном давлении и высушивали с помощью масляного насоса с получением неочищенного продукта **5e**, представляющего собой 2-((2-аминоацетамидо)метокси)-2-циклопропил-*N*-((1*S*,9*S*)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1*H*,12*H*-

5 бензо[*de*]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-*b*]хинолин-1-ил)ацетамид (23 мг), и продукт использовали непосредственно в следующей реакции без очистки.

МС *m/z* (ИЭР): 638,0[*M*+18].

Стадия 6: неочищенный продукт **5e** (20 мг, 32,3 мкмоль) растворяли в 1 мл *N,N*-диметилформамида, три раза выполняли замену атмосферы аргоном, затем смесь охлаждали до 0-5°C на водяной бане со льдом; добавляли раствор **4g** (31,8 мг, 67,3 мкмоль) в 0,5 мл *N,N*-диметилформамида, добавляли хлорид 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолина (27,8 мг, 94,3 мкмоль) и обеспечивали прохождение реакции в смеси при перемешивании на ледяной бане в течение 10 мин; ледяную баню удаляли, и реакционную жидкость нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 1 ч, реакция обеспечивала образование соединения **5**. Реакционную жидкость очищали посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (условия разделения: хроматографическая колонка: XBridge Prep C18 OBD, 5 мкм, 19\*250 мм; подвижная фаза: А-вода (10 ммоль NH<sub>4</sub>OAc): В-ацетонитрил, градиентное элюирование, скорость потока: 18 мл/мин), соответствующие компоненты собирали и концентрировали при пониженном давлении с получением продуктов 5-А и 5-В (3,6 мг, 2,6 мг).

МС *m/z* (ИЭР): 1074,4 [*M*+1].

Представленное в одной конфигурации соединение 5-А (более короткое время удерживания):

анализ посредством СВЭЖХ (сверхэффективная жидкостная хроматография): время удерживания 1,14 мин, чистота: 85% (хроматографическая колонка: ACQUITY UPLC BEH C18, 1,7 мкм, 2,1\*50 мм, подвижная фаза: А-вода (5 ммоль NH<sub>4</sub>OAc), В-ацетонитрил).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO (от англ. dimethylsulphoxide – диметилсульфоксид)-*d*<sub>6</sub>): δ 8,60 (t, 1H), 8,51-8,49 (d, 1H), 8,32-8,24 (m, 1H), 8,13-8,02 (m, 2H), 8,02-7,96 (m, 1H), 7,82-7,75 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,26-7,15 (m, 4H), 6,99 (s, 1H), 6,55-6,48 (m, 1H), 5,65-5,54 (m, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,35-5,15 (m, 3H), 4,74-4,62 (m, 2H), 4,54-4,40 (m, 2H), 3,76-3,64 (m, 4H), 3,62-3,48 (m, 2H), 3,20-3,07 (m, 2H), 3,04-2,94 (m, 2H), 2,80-2,62 (m, 2H), 2,45-2,30 (m, 3H), 2,25-2,15 (m, 2H), 2,15-2,04 (m, 2H), 1,93-1,78 (m, 2H), 1,52-1,39 (m, 3H), 1,34-1,12 (m, 5H), 0,87 (t, 3H), 0,64-0,38 (m, 4H).

35 Представленное в одной конфигурации соединение 5-В (более длительное время удерживания):

анализ посредством СВЭЖХ: время удерживания 1,16 мин, чистота: 89% (хроматографическая колонка: ACQUITY UPLC BEH C18, 1,7 мкм, 2,1\*50 мм, подвижная фаза: А-вода (5 ммоль NH<sub>4</sub>OAc), В-ацетонитрил).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,68-8,60 (m, 1H), 8,58-8,50 (m, 1H), 8,32-8,24 (m, 1H), 8,13-8,02 (m, 2H), 8,02-7,94 (m, 1H), 7,82-7,75 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,26-7,13 (m, 4H), 6,99 (s, 1H), 6,55-6,48 (m, 1H), 5,60-5,50 (m, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,35-5,15 (m, 3H), 4,78-4,68 (m, 1H), 4,60-4,40 (m, 2H), 3,76-3,58 (m, 4H), 3,58-3,48 (m, 1H), 3,20-3,10 (m, 2H), 3,08-2,97 (m, 2H), 2,80-2,72 (m, 2H), 2,45-2,30 (m, 3H), 2,25-2,13 (m, 2H), 2,13-2,04 (m, 2H), 2,03-1,94 (m, 2H), 1,91-1,78 (m, 2H), 1,52-1,39 (m, 3H), 1,34-1,12 (m, 5H), 0,91-0,79 (m, 3H), 0,53-0,34 (m, 4H).

Способы получения других промежуточных соединений предусматривают ссылку на промежуточное соединение 5.

При 37°C приготовленный водный раствор трис(2-карбоксиэтил)фосфина (10 мМ, 0,347 мл, 3,47 мкмоль) добавляли к раствору антитела HU6DL.R54 в водном растворе буфера PBS (0,05 М водный раствор буфера PBS с pH, равным 6,5; 7,3 мл, 13,8 мг/мл, 0,681 мкмоль), и смесь помещали на шейкер на водяной бане, и обеспечивали прохождение реакции при 37°C в течение 3 ч при встряхивании, а затем реакцию останавливали. Реакционную жидкость охлаждали до 25°C на водяной бане, разбавляли до 14,0 мл, и 3,3 мл разбавленной реакционной жидкости извлекали для реакции.

Соединение **5-A** (5,0 мг, 2,75 мкмоль) растворяли в 0,15 мл DMSO, полученную смесь добавляли к вышеуказанным 3,3 мл раствора, и смесь помещали на шейкер на водяной бане, и обеспечивали прохождение реакции при 25°C в течение 3 ч при встряхивании, а затем реакцию останавливали. Реакционную жидкость обессоливали и очищали с помощью колонки с гелем Sephadex G25 (элюентная фаза: 0,05 М водный раствор буфера PBS с pH 6,5, содержащий 0,001 М EDTA (от англ. ethylenediaminetetraacetic acid – этилендиаминтетраацетат)) с получением соединения 1 в растворе буфера PBS (1,45 мг/мл, 17 мл), который выдерживали при низкой температуре и хранили при 4°C.

Среднее значение у определяли с применением способа с использованием УФ-излучения. Кювету, содержащую буфер на основе сукцината натрия, помещали в ячейку для измерения поглощения эталоном, и ячейку для измерения поглощения образцом, соответственно, затем осуществляли вычет значения для холостого растворителя, и кювету, содержащую раствор тестируемого изделия, помещали в ячейку для измерения поглощения образцом, и определяли поглощение при 280 нм и 370 нм.

Обработка данных



Путем построения стандартной кривой измеряли поглощение при длине волны 280 нм с определением содержания антитела Cstab и измеряли поглощение при длине волны 370 нм с определением содержания малых молекул CDrug.

Средняя нагрузка лекарственным средством  $y = CDrug/Cstab$ .

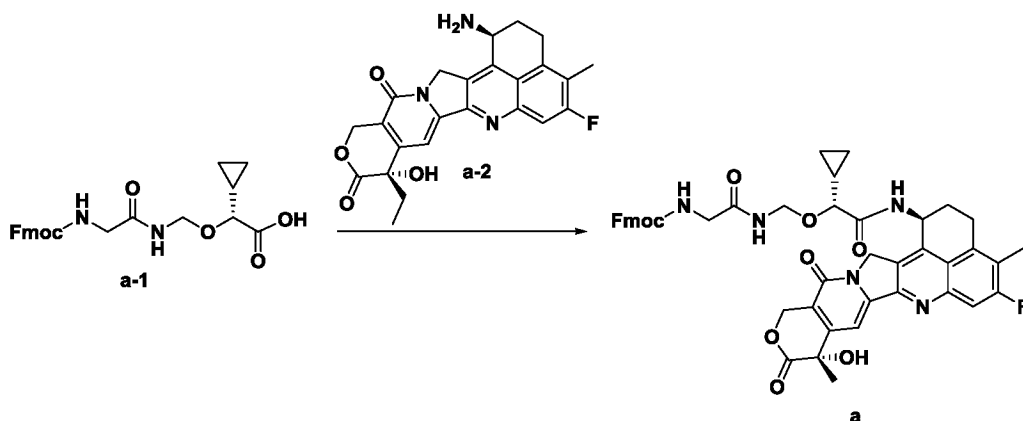
5 Нагрузку лекарственным средством продукта определяли посредством вышеуказанного способа, а образец соединения 1 ( $y$  равен 4) получали посредством очистки с использованием УФ-ВЭЖХ.

Способ получения соединений 2-9 предусматривает ссылку на соединение 1.

10

### Пример 7. Синтез соединения 10

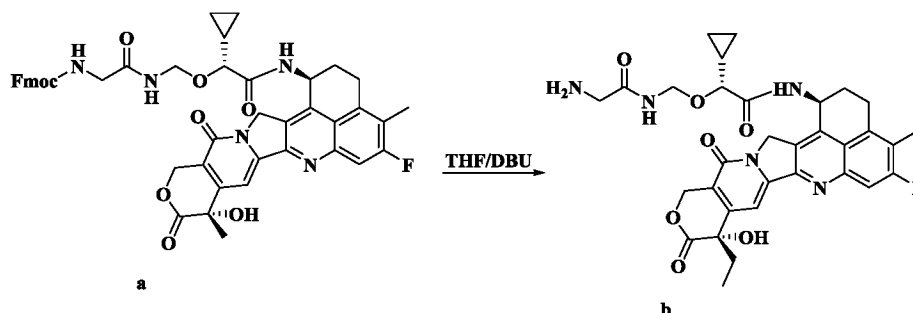
Синтез соединения а



Исходный материал **a-1** (4,1 г, 9,71 ммоль) и исходный материал **a-2** (4,3 г, 8,09 ммоль, содержащий 4% аминокислотных примесей) отбирали и помещали в реакционный флакон объемом 250 мл. В защитной атмосфере азота добавляли DCM (от англ. dichloromethane – дихлорметан) (54 мл) и MeOH (18 мл), и смесь перемешивали и охлаждали до 0°C. Добавляли DMTMM (3,6 г, 12,1 ммоль) и триэтиламин (2,5 г, 24,2 ммоль) и обеспечивали протекание реакции в смеси при перемешивании при 0°C в течение 1 ч. ВЭЖХ показала, что реакция с участием исходного материала **a-2** завершалась, и реакционную жидкость выпаривали при пониженном давлении (меньше 25°C). Добавляли MTBE (120 мл), и смесь перемешивали и суспендировали (взвесь), и раствор выливали и фильтровали. К взвеси снова добавляли 120 мл MTBE и смесь суспендировали (твердое вещество) и фильтровали. Осадок на фильтре промывали водой (60 мл × 2) и высушивали на воздухе с получением неочищенного продукта.

25 Неочищенный продукт растворяли в дихлорметане и метаноле, и смесь дважды разделяли посредством колоночной хроматографии с набивкой колонки мокрым методом (элюент DCM: MeOH = 40: 1-20: 1) с получением чистого соединения **a** (6,2 г, 7,37 ммоль), чистота: 99,3%, выход 91%.

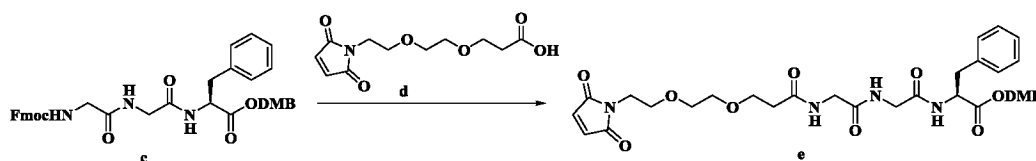
Синтез соединения **b**



Соединение а (5,7 г, 6,77 ммоль) отбирали и помещали в трехгорлую колбу объемом 500 мл. Сухой THF (от англ. tetrahydrofuran – тетрагидрофуран) (114 мл) добавляли в защитной атмосфере азота и растворяли при перемешивании и внутреннюю температуру снижали охлаждением до приблизительно  $-10^{\circ}\text{C}$ . Добавляли DBU (3,09 г, 20,31 ммоль), внутреннюю температуру поддерживали при значениях от  $-10^{\circ}\text{C}$  до  $-5^{\circ}\text{C}$  в ходе добавления по каплям и добавление завершали через 5 мин. После добавления по каплям внутреннюю температуру поддерживали при значениях от  $-10^{\circ}\text{C}$  до  $-5^{\circ}\text{C}$  и обеспечивали осуществление реакции смеси в течение 2,5 ч до осаждения твердого вещества.

Внутреннюю температуру снижали охлаждением до  $-20^{\circ}\text{C}$ , добавляли МТВЕ (114 мл), в ходе чего внутреннюю температуру поддерживали при значениях от  $-20^{\circ}\text{C}$  до  $-10^{\circ}\text{C}$ . Продукт полностью осаждали и фильтровали, и осадок на фильтре промывали с помощью МТВЕ (57 мл  $\times$  2). После фильтрования с аспирацией до сухого состояния получали неочищенный продукт, представляющий собой соединение b (6 г), и его хранили при  $-78^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего применения.

#### Синтез соединения е



Соединение с (651 мг, 1 ммоль) растворяли в 10 мл DCM, перемешивание начинали при охлаждении на ледяной бане и по каплям добавляли DBU (456 мг, 3 ммоль). Реакцию завершали после прохождения реакции в течение одного часа на ледяной бане. Последовательно добавляли соединение d (257 мг, 1 ммоль) и HATU (420 мг, 1,1 ммоль). После перемешивания на ледяной бане в течение 30 мин ЖХ-МС (жидкостная хроматография-масс-спектрометрия) показывала, что реакция завершилась. Реакционную жидкость концентрировали при  $25^{\circ}\text{C}$ , и остаток очищали посредством прибора для колоночной хроматографии с обращенной фазой (ACN (от англ. acetonitrile – ацетонитрил) /  $\text{H}_2\text{O}$ , 50% продукта) с получением соединения е в виде красновато-коричневого твердого вещества (130 мг, выход 19%).

МС: 691,3 [M+23].

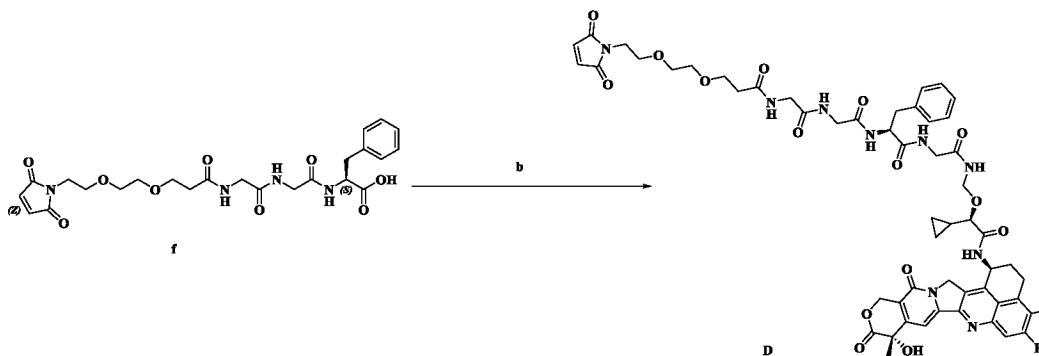
## Синтез соединения f



Соединение e (130 мг, 0,19 ммоль) растворяли в DCM, добавляли анизол (62 мг, 0,57 ммоль) и дихлоруксусную кислоту (245 мг, 1,9 ммоль), реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи в общей сложности в течение 16 ч и отбор образцов выполняли для осуществления контроля посредством ЖХ-МС, результаты которого указывали на то, что исходные материалы были полностью израсходованы. Реакцию останавливали, реакционную жидкость концентрировали при 25°C, и остаток очищали посредством колоночной хроматографии с обращенной фазой (ACN/H<sub>2</sub>O, 30% продукта) с получением соединения f в виде розового твердого вещества (53 мг, выход 54%).

МС: 519,2 [M+1].

## Синтез соединения D



Соединение f (23 мг, 0,044 ммоль) и соединение b (27 мг, 0,044 ммоль) растворяли в DCM (3 мл) и MeOH (1 мл) и смесь охлаждали до -30°C в защитной атмосфере азота. Добавляли DMTMM (20 мг, 0,067 ммоль), и реакцию проводили при температуре от -20°C до -10°C в течение 1 ч. Отбор образцов проводили для выполнения контроля посредством ЖХ-МС, результаты которого указывали на то, что исходные материалы были полностью израсходованы. Температуру контролировали на уровне -10°C, добавляли 10 мл воды с обеспечением гашения реакции и 30 мл DCM добавляли для обеспечения расслоения. Водную фазу экстрагировали с использованием DCM/MeOH = 10/1 (50 мл). Органические фазы объединяли, высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении при 25°C. Остаток очищали посредством препаративного способа (ACN/H<sub>2</sub>O/0,05% FA) с получением соединения D в виде белого твердого вещества (5,8 мг, выход 12%, чистота согласно ВЭЖХ 98,87%).

МС: 1120,3 [M+1].

Спектр водорода показан на фиг. 1.

При 37°C приготовленный водный раствор трис(2-карбоксиитил)фосфина (10 мМ, 0,239 мл, 1,70 мкмоль) добавляли к раствору антитела HU6DL.R54 в водном растворе буфера PBS (0,05 М водный раствор буфера PBS с рН, равным 6,5; 7,3 мл, 13,8 мг/мл, 0,681 мкмоль), и смесь помещали на шейкер на водяной бане, и обеспечивали прохождение реакции при 37°C в течение 3 ч при встряхивании, а затем реакцию останавливали. Реакционную жидкость охлаждали до 25°C на водяной бане, разбавляли до 14,0 мл и 3,3 мл разбавленной реакционной жидкости извлекали для проведения реакции.

Соединение D (3,0 мг, 3,72 мкмоль) растворяли в 0,15 мл DMSO, полученную смесь добавляли к вышеуказанным 3,3 мл раствора, и смесь помещали на шейкер на водяной бане, и обеспечивали осуществление реакции при 25°C в течение 3 ч при встряхивании, а затем реакцию останавливали. Реакционную жидкость обессоливали и очищали с помощью колонки с гелем Sephadex G25 (элюентная фаза: 0,05 М водный раствор буфера PBS с рН 6,5, содержащий 0,001 М EDTA) с получением соединения 10 - конъюгата с антителом mAb2 в растворе буфера PBS (1,35 мг/мл, 13 мл), который выдерживали при низкой температуре и хранили при 4°C.

Среднее значение  $y$  определяли с применением способа с использованием УФ-излучения. Кювету, содержащую буфер на основе сукцината натрия, помещали в ячейку для измерения поглощения эталоном и ячейку для измерения поглощения образцом, соответственно, затем осуществляли вычет значения для холостого растворителя, и кювету, содержащую раствор тестируемого изделия, помещали в ячейку для измерения поглощения образцом, и определяли поглощение при 280 нм и 370 нм.

#### Обработка данных

Путем построения стандартной кривой измеряли поглощение при длине волны 280 нм с определением содержания антитела  $C_{\text{mAb}}$  и измеряли поглощение при длине волны 370 нм с определением содержания малых молекул  $CD_{\text{Drug}}$ .

Средняя нагрузка лекарственным средством  $y = CD_{\text{Drug}}/C_{\text{mAb}}$ .

Нагрузку лекарственным средством продукта определяли посредством вышеуказанного способа, а образец соединения 10 ( $y$  равен 4) получали посредством очистки с использованием УФ-ВЭЖХ.

Способ получения соединений 11 - 18 предусматривает ссылку на соединение 10.

### **Пример 8. Активность конъюгата антитело-лекарственное средство по уничтожению клеток**

Для оценки  $y$  конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению эффекта уничтожения в отношении опухолевых клеток Тгор-2-позитивную клеточную линию MDA-MB-468 использовали для проведения оценки. Культивируемые в

виде монослоя клетки MDA-MB-468 расщепляли трипсином, добавляли культуральную среду для ресуспендирования расщепленных клеток, после центрифугирования клетки подсчитывали, плотность клеток доводили до  $4 \times 10^4$  клеток/мл с использованием полной культуральной среды, а затем клетки высевали в 60 лунок, расположенных в центральной части 96-луночного планшета с прозрачным дном (Corning, кат. № 3610), в количестве 50 мкл/лунка, и число клеток составляло 2000 клеток/лунка. Культуральную среду добавляли в краевые лунки в количестве 100 мкл/лунка. Планшет для клеток помещали в инкубатор при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> для культивирования в течение ночи. На следующий день использовали полную культуральную среду для разведения рабочего раствора конъюгата антитело-лекарственное средство в 96-луночном планшете с V-образным дном (Corning, кат. № 3894). Исходная концентрация составляла 10000 нМ, для получения 9 градиентов концентрации выполняли 10-кратное разведение. После завершения процедуры приготовления раствор добавляли в белый 96-луночный планшет в количестве 50 мкл/лунка в двух повторностях. Планшет для клеток помещали в инкубатор при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> для дальнейшего культивирования в течение 6 суток. На 6-ые сутки эксперимента выполняли считывание: планшет для культивирования клеток извлекали и уравнивали до комнатной температуры, 50 мкл реагента для определения жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® (Promega, кат. №: G7573) добавляли в каждую лунку, смесь встряхивали и смешивали до однородного состояния, планшет помещали в темноту на 20 мин, а затем значение сигнала хемилюминесценции определяли при 490 нм и 500 мс/лунка посредством микропланшет-ридера. Степень ингибирования (%) рассчитывали, исходя из значения сигнала люминесценции,

формула для расчета представляла собой следующее:

Степень ингибирования (%) =  $(1 - \frac{\text{значение сигнала для лунки с образцом}}{\text{среднее значение сигнала для контрольной лунки}}) \times 100$ .

Лунка с образцом представляла собой лунку с клетками, обработанными тестируемым лекарственным средством, а контрольная лунка представляла собой лунку с клетками, обработанными полной культуральной средой.

Аппроксимация кривой: в соответствии со степенью ингибирования (%), соответствующей каждой концентрации, выполняли аппроксимацию кривой с получением значения IC<sub>50</sub>, используя имеющееся в GraphPad Prism 6.0 уравнение для расчета переменного углового коэффициента кривой зависимости log(ингибитор) от величины ответа (четыре параметра), при этом логарифмическое значение концентрации задавали в качестве оси X, а степень ингибирования – в качестве оси Y. Уравнение для расчета представляло собой следующее:

$Y$  = значение для нижнего плато кривой + (значение для верхнего плато кривой - значение для нижнего плато кривой)/(1 + 10<sup>^</sup>((LogIC<sub>50</sub>-X)\*угловой коэффициент Хилла)).  
Результаты эксперимента являлись такими, как показано в следующей таблице.

5      Таблица 8. Эффект конъюгата антитело-лекарственное средство, заключающийся в уничтожении опухолевых клеток

Конъюгат антитело- лекарственное средство (ADC)	IC <sub>50</sub> (нМ)
	MDA-MB-468
Соединение 14 (y = 4)	3,4
Соединение 5 (y = 4)	5,7
hlgG1 - соединение 5-A (y = 4)	164,2

При сравнении IC<sub>50</sub> уничтожения клеток результаты эксперимента показали, что по сравнению с отрицательным контролем, все конъюгированные с антителом лекарственные средства по настоящему изобретению характеризовались очень сильными эффектами уничтожения клеток.

#### Пример 9. Фармакокинетика конъюгата антитело-лекарственное средство

15      Модель на основе мышей BALB/c использовали для оценки у мышей метаболизма лекарственного средства - конъюгата антитело к Trop-2-лекарственное средство Tro-2 ADC. Мышей BALB/c со средней массой 18-22 г и возрастом 6-8 недель произвольным образом разделяли на 3 группы по 3 животных в каждой группе. Все тестируемые конъюгаты антитело-лекарственное средство Trop-2 ADC вводили в количестве 4 мг/кг массы тела в виде однократного в/в (внутривенного) введения, и кровь отбирали через  
20      0,5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 144 и 240 ч соответственно, и плазму отделяли, замораживали и хранили в холодильнике при -20°C. Затем полностью прозрачный 96-луночный планшет (Corning, кат. № 3590), характеризующийся высокой аффинностью, покрывали поликлональным антителом к ADC. Добавляли разбавленные образцы плазмы, подлежащие тестированию, а затем определяли концентрацию Trop-2 ADC в плазме  
25      мышей с использованием HRP-меченного фрагмента F(ab')<sub>2</sub> вторичного антитела козы к F(ab')<sub>2</sub> IgG1 человека, и PK-параметр анализировали с применением некомпартментной модели и модели внутрисосудистого введения в программном обеспечении PKSolver. Подробное описание результатов эксперимента приведено в таблице ниже.

30      Таблица 9. Фармакокинетические параметры конъюгатов антитело-лекарственное средство

PK-параметры	Единица	Соединение 14 (y =	Соединение 5 (y =
--------------	---------	--------------------	-------------------

	<b>измерения</b>	4)	4)
t1/2	ч	189,5	179,8
Tmax	ч	0,5	0,5
Cmax	нг/мл	411,8	333,8
AUC 0-t	нг/мл*ч	49388,7	40735,8
MRT 0- беск._наблюд.	ч	265,3	259,1
Cl_наблюд.	(мг/кг)/(нг/мл)/ч	8,099E-05	9,819E-05

При объединении значений параметров, таких как период полужизни t1/2, время до достижения пиковой концентрации лекарственного средства в крови Tmax, концентрация лекарственного средства в крови Cmax и скорость клиренса Cl\_наблюд., конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению показали хорошие метаболитические характеристики.

#### Пример 10. Противоопухолевый эффект конъюгата антитело-лекарственное средство *in vivo*

С целью дополнительного исследования ингибирующего эффекта конъюгата антитело-лекарственное средство в отношении опухолей, образовавшихся *in vivo*, использовали мышиную модель трансплантата опухолевых клеток, представляющих собой Tgp-2-позитивные опухолевые клетки NCI-N87 рака желудка человека, для оценки ингибирующего эффекта кандидатной молекулы в отношении опухолевой пролиферации *in vivo*. Бестимусным мышам (бестимусные Balb/c) 8-недельного возраста, имеющим массу приблизительно 18-20 мг, посредством инъекции подкожно вводили  $5 \times 10^6$  клеток NCI-N87. Спустя 10 суток, средний объем опухоли достигал 160 мм<sup>3</sup>, и выполняли распределение по группам, и начинали внутривенное инъекционное введение конъюгата антитело-лекарственное средство каждые 2 недели в дозе 4 мг/кг. В качестве контроля использовали антитело изотипического контроля, представляющее собой IgG1 человека, в дозе 4 мг/кг. В случае контрольной группы или группы введения каждая группа включала 5 мышей. Степень ингибирования опухоли рассчитывали путем измерения объема опухоли.

Степень ингибирования опухоли =  $100\% - (\text{объем опухоли группы введения в сутки 28} - \text{объем опухоли группы введения в сутки 0}) / (\text{объем опухоли контрольной группы в сутки 28} - \text{объем опухоли контрольной группы в сутки 0})$ .

Таблица 10. Эффект конъюгата антитело-лекарственное средство, заключающийся в уничтожении опухоли

Группа введения	Дозировка	Частота	Степень ингибирования
-----------------	-----------	---------	-----------------------

			<b>опухоли (%)</b>
Изотипич. hlgG1	4 мг/кг	Q2W	-
Соединение 14 (y = 4)	4 мг/кг	Q2W	122,44
Соединение 5 (y = 4)	4 мг/кг	Q2W	141,21

Q2W – 1 раз в две недели

Результаты эксперимента показали, что при введении путем инъекции, осуществляемом один раз в 2 недели в дозе 4 мг/кг, все конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению продемонстрировали хороший эффект ингибирования опухоли. Кроме того, конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению также показали высокую степень ингибирования опухоли при низких дозах.

#### 10      **Пример 11. Дозозависимый противоопухолевый эффект конъюгата антитело-лекарственное средство *in vivo***

С целью дополнительного исследования ингибирующего эффекта конъюгата антитело-лекарственное средство в отношении опухолей, образовавшихся *in vivo*, использовали мышиную модель трансплантата опухолевых клеток, представляющих собой Тrop-2-позитивные опухолевые клетки NCI-N87 рака желудка человека, для оценки ингибирующего эффекта кандидатной молекулы в отношении опухолевой пролиферации *in vivo*. Бестимульным мышам (бестимульные Balb/c) 6-недельного возраста, имеющим массу приблизительно 18-22 мг, подкожно посредством инъекции вводили  $5 \times 10^6$  клеток NCI-N87. Спустя 8 суток средний объем опухоли достигал 175 мм<sup>3</sup>, и выполняли распределение по группам, и начинали внутривенное инъекционное введение конъюгата антитело-лекарственное средство каждые 2 недели в дозе 2 мг/кг или 1 мг/кг. В качестве контроля использовали антитело изотипического контроля, представляющее собой IgG1 человека, в дозе 2 мг/кг. В случае контрольной группы или группы введения каждая группа включала 5 мышей. Степень ингибирования опухоли рассчитывали путем измерения объема опухоли.

Степень ингибирования опухоли =  $100\% - (\text{объем опухоли группы введения в сутки 28} - \text{объем опухоли группы введения в сутки 0}) / (\text{объем опухоли контрольной группы в сутки 28} - \text{объем опухоли контрольной группы в сутки 0})$ .

#### 30      **Таблица 11. Эффект конъюгата антитело-лекарственное средство, заключающийся в уничтожении опухоли**

<b>Группа введения</b>	<b>Дозировка</b>	<b>Частота</b>	<b>Степень ингибирования опухоли (%)</b>
------------------------	------------------	----------------	--



Изотипич. hlgG1	2 мг/кг	Q2W	-
Соединение 14 (y = 4)	2 мг/кг	Q2W	124,25
Соединение 14 (y = 4)	1 мг/кг	Q2W	85,97
DS-1062-соединение D (y = 4)	1 мг/кг	Q2W	78,2

Результаты эксперимента показали, что при введении один раз в 2 недели в дозе 2 мг/кг или 1 мг/кг в течение 28 суток конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению показали хороший эффект ингибирования опухоли, оказываемый на несущую опухоль мышиную модель клеток рака желудка человека NCI-N87 CDX, и показали наличие дозозависимого эффекта.

**Пример 12. Исследование на модели *in vivo* эффективности конъюгата антитело-лекарственное средство в отношении клеток плоскоклеточной карциномы головы и шеи FaDu**

С целью дополнительного исследования ингибирующего эффекта конъюгата антитело-лекарственное средство в отношении опухолей, образовавшихся *in vivo*, использовали мышиную модель трансплантата опухолевых клеток, представляющих собой Тrop-2-позитивные опухолевые клетки FaDu плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека, для оценки ингибирующего эффекта кандидатной молекулы в отношении опухолевой пролиферации *in vivo*. Добавляли клеточную суспензию, смешанную с Matrigel в равных долях, и бестимусным мышам (бестимусные Balb/c) 6-недельного возраста, имеющим массу приблизительно 18-22 мг, посредством инъекции подкожно вводили  $5 \times 10^6$  клеток FaDu на животное. Спустя 8 суток, средний объем опухоли достигал 133 мм<sup>3</sup>, и выполняли распределение по группам, и начинали внутривенное инъекционное введение конъюгата антитело-лекарственное средство в однократной дозе 3 мг/кг или 1 мг/кг. В качестве контроля использовали антитело изотипического контроля, представляющее собой IgG1 человека, в дозе 3 мг/кг. В случае контрольной группы или группы введения каждая группа включала 5 мышей. Степень ингибирования опухоли рассчитывали путем измерения объема опухоли.

Степень ингибирования опухоли =  $100\% - (\text{объем опухоли группы введения в сутки 17} - \text{объем опухоли группы введения в сутки 0}) / (\text{объем опухоли контрольной группы в сутки 17} - \text{объем опухоли контрольной группы в сутки 0})$ .

Таблица 12. Эффект конъюгата антитело-лекарственное средство, заключающийся в уничтожении опухоли

Группа введения	Дозировка	Частота	Степень ингибирования
-----------------	-----------	---------	-----------------------

			опухоли (%)
Изотипич. hlgG1	3 мг/кг	Однократная доза	-
Соединение 14	3 мг/кг	Однократная доза	200
DS-1062 (DAR4 70%)	3 мг/кг	Однократная доза	200
Соединение 14	1 мг/кг	Однократная доза	200
DS-1062	1 мг/кг	Однократная доза	74,8

Результаты эксперимента показали, что после распределения по группам случайным образом и введения однократной дозы обе дозы 3 мг/кг и 1 мг/кг оказывали крайне выраженный эффект ингибирования опухоли на несущей опухоль мышинной модели плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека FaDu CDX со степенью ингибирования опухоли, достигающей 200%, спустя 17 суток после введения в дозе 3 мг/кг или 1 мг/кг.

**Пример 13. Исследование на модели *in vivo* эффективности конъюгата антитело-лекарственное средство в отношении клеток рака легкого Calu-3**

С целью дополнительного исследования ингибирующего эффекта конъюгата антитело-лекарственное средство в отношении опухолей, образовавшихся *in vivo*, использовали мышиную модель трансплантата опухолевых клеток, представляющих собой Ttop-2-позитивные опухолевые клетки Calu-3 рака легкого, для оценки ингибирующего эффекта кандидатной молекулы в отношении опухолевой пролиферации *in vivo*. Добавляли клеточную суспензию, смешанную с Matrigel в равных долях, и бестимусным мышам (бестимусные Balb/c) 6-недельного возраста, имеющим массу приблизительно 18-22 мг, посредством инъекции подкожно вводили  $2 \times 10^6$  клеток Calu-3 на животное. Спустя 8 суток, средний объем опухоли достигал 148 мм<sup>3</sup>, и выполняли распределение по группам, и начинали внутривенное инъекционное введение конъюгата антитело-лекарственное средство в однократной дозе 10 мг/кг. В качестве контроля использовали антитело изотипического контроля, представляющее собой IgG1 человека, в дозе 10 мг/кг. В случае контрольной группы или группы введения каждая группа включала 5 мышей. Степень ингибирования опухоли рассчитывали путем измерения объема опухоли.

Степень ингибирования опухоли =  $100\% - (\text{объем опухоли для группы введения в сутки 21} - \text{объем опухоли группы введения в сутки 0}) / (\text{объем опухоли для контрольной группы в сутки 21} - \text{объем опухоли контрольной группы в сутки 0})$ .

Таблица 13. Эффект конъюгата антитело-лекарственное средство, заключающийся в уничтожении опухоли

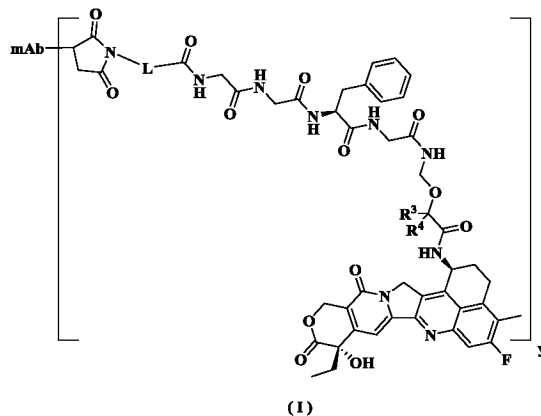
Группа введения	Дозировка	Частота	Степень ингибирования опухоли (%)
Изотипич. hlgG1	10 мг/кг	Однократная доза	-
Соединение 14	10 мг/кг	Однократная доза	100,35
DS-1062	10 мг/кг	Однократная доза	85,61

5 Результаты эксперимента показали, что после распределения по группам случайным образом и введения однократной дозы, и конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению демонстрировали выраженный эффект ингибирования опухоли, оказываемый в отношении несущей опухоль мышшиной модели рака легкого человека Calu-3 CDX, причем степень ингибирования опухоли достигала

10 100%, спустя 21 сутки после введения в дозе 10 мг/кг.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение:



где:

L представляет собой  $-(CR^1R^2)_m-[X_1-(CR^1R^2)_n-X_2]_t-(CR^1R^2)_r-$ ;

каждый из  $R^1$  или  $R^2$  независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, дейтерия, гидроксила, амина, алкила, галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила и гидроксиалкила, предпочтительно  $R^1$  или  $R^2$  представляет собой атом водорода;

каждый из  $X_1$  или  $X_2$  независимо выбран из группы, состоящей из связи, N, O и S; предпочтительно  $X_1$  или  $X_2$  представляет собой связь или O,

каждый из m, n, r или t независимо выбран из группы, состоящей из 1, 2, 3 и 4, предпочтительно каждый из m, n, r или t независимо равен 1 или 2;

каждый из  $R^3$  или  $R^4$  независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила;

или  $R^3$  и  $R^4$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

y равен 1-20, предпочтительно 1-10, более предпочтительно 2-8 и еще более предпочтительно 4, 6 или 8;

mAb представляет собой антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент, который содержит:

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в RIDPXDSETHYNQKFKD, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8,

и X представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из R, Y, Q, L, T, I, F, E и A.

2. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по п. 1, где антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающие фрагменты содержат:

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 9, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 10, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 11, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 12, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 13, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 14, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 15, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 16, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8; или

HCDR1, как показано в SEQ ID NO: 3, HCDR2, как показано в SEQ ID NO: 17, и HCDR3, как показано в SEQ ID NO: 5; и LCDR1, как показано в SEQ ID NO: 6, LCDR2, как показано в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, как показано в SEQ ID NO: 8.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по п. 1, где антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из мышинового антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, химерного антитела или его

антигенсвязывающего фрагмента, антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента и гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

4. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по п. 1, где антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека или ее вариант,

предпочтительно антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи IgG1, IgG2 или IgG4 человека;

и более предпочтительно антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 48 или как показано в SEQ ID NO: 1.

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по п. 1, где антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область легкой цепи каппа-цепи, лямбда-цепи антитела человека или ее вариант;

предпочтительно антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область легкой цепи каппа-цепи антитела человека;

и более предпочтительно антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 2.

6. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по любому из п.п. 1-5, где антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из следующей последовательности, или переменную область тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 70%-ной, 75%-ной, 80%-ной, 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной или 99%-ной идентичностью со следующей последовательностью: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27;

и/или переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 19 или обладающую по меньшей мере 70%-ной, 75%-ной, 80%-ной, 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной или 99%-ной идентичностью с SEQ ID NO: 19.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по п. 6, где антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

вариабельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 20, и вариабельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

вариабельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

вариабельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 22, и вариабельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

вариабельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

вариабельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 24, и вариабельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

вариабельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 25, и вариабельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

вариабельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 26, и вариабельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19; или

вариабельную область тяжелой цепи, как показано в SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, как показано в SEQ ID NO: 19.

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по п. 6, где антитело к TROP-2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из следующей последовательности, или тяжелую цепь, обладающую по меньшей мере 80%-ной, 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной или 99%-ной идентичностью со следующей последовательностью: SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37;

и/или легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29 или обладающую по меньшей мере 80%-ной, 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной или 99%-ной идентичностью с SEQ ID NO: 29.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по п. 8, где антитело к TROP-2 содержит:

тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 28, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 31, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 32, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

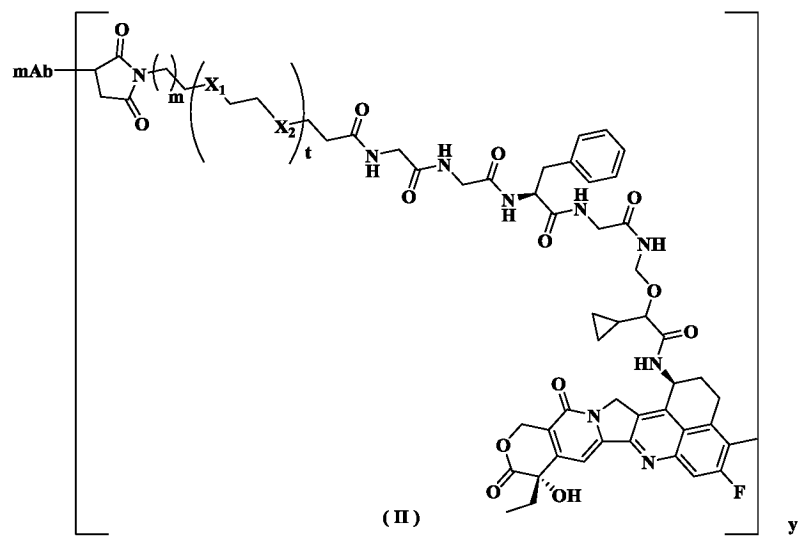
тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 34, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 35, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 36, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29; или

тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 37, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 29.

10. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по любому из п.п. 1-9, где конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение выбраны из группы, состоящей из конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы (II) или его фармацевтически приемлемой соли, сольватного соединения, таутомера, мезомера, рацемата, энантиомера или диастереомера и их смеси:



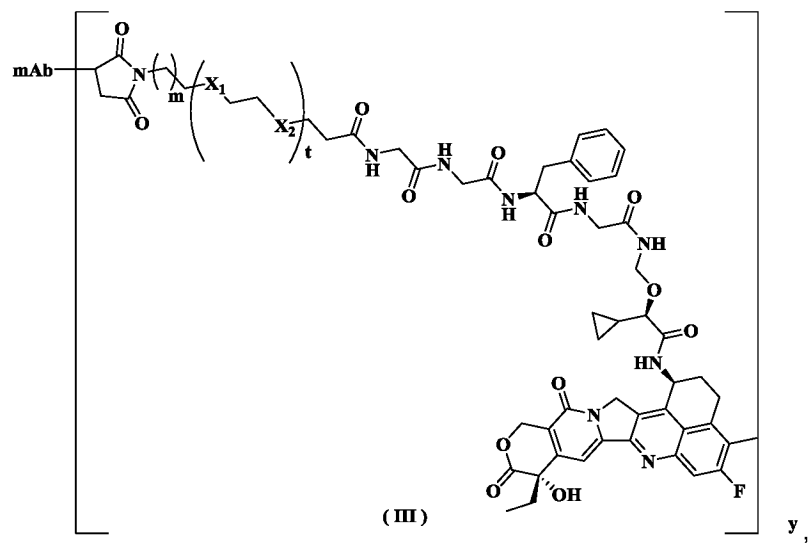
$X_1$  или  $X_2$  представляет собой связь или O;

$m$  равен 0 или 1; и



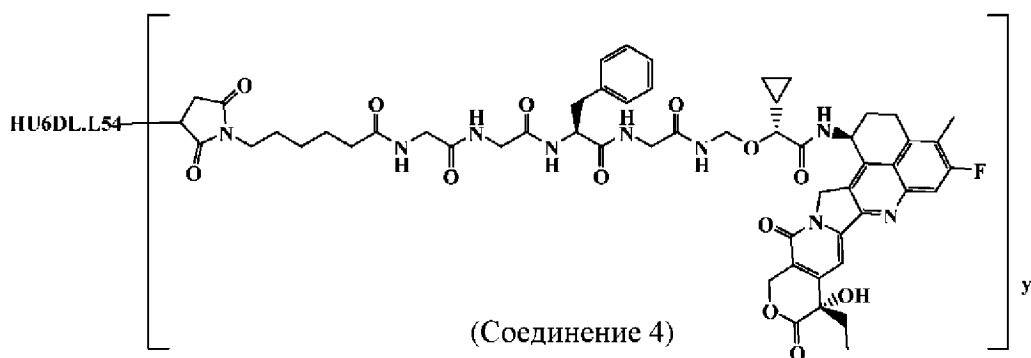
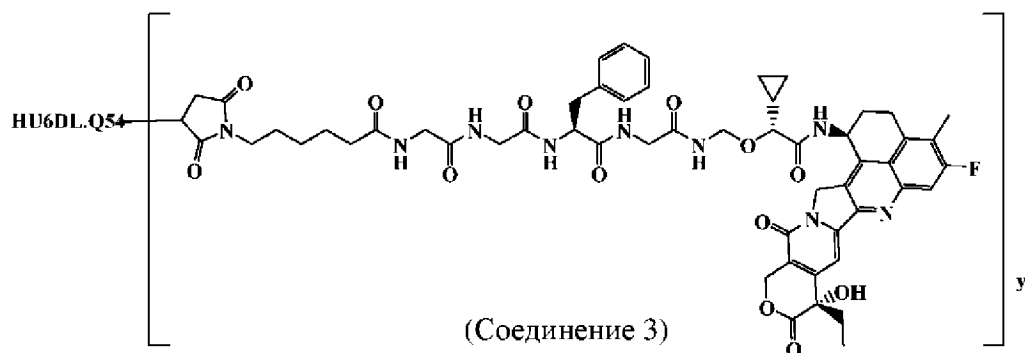
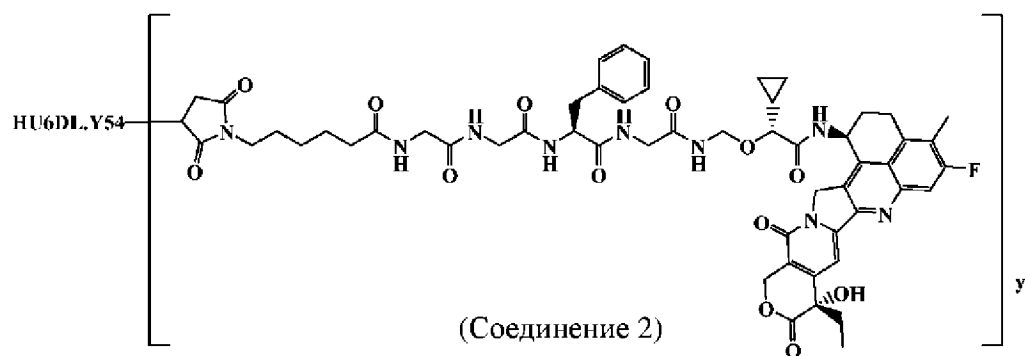
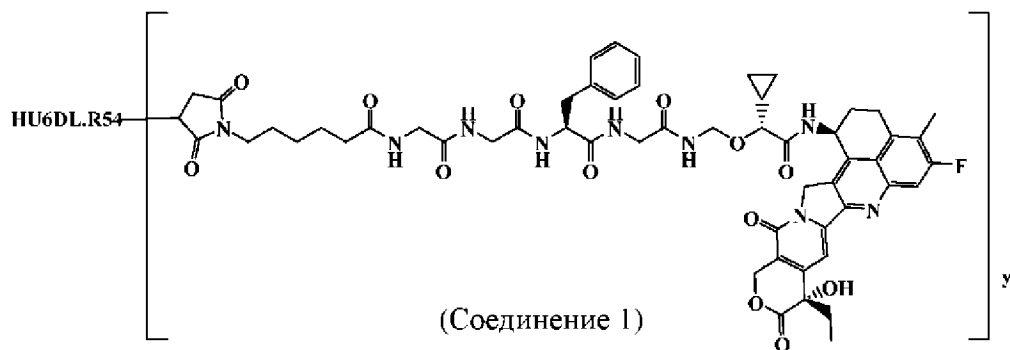
t равен 1 или 2.

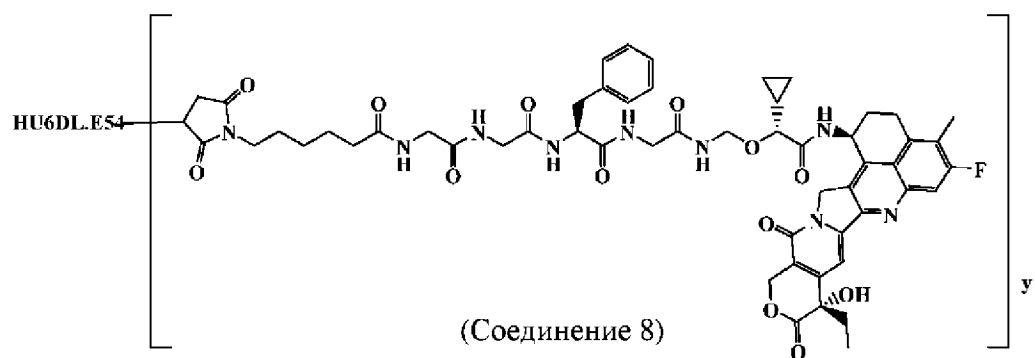
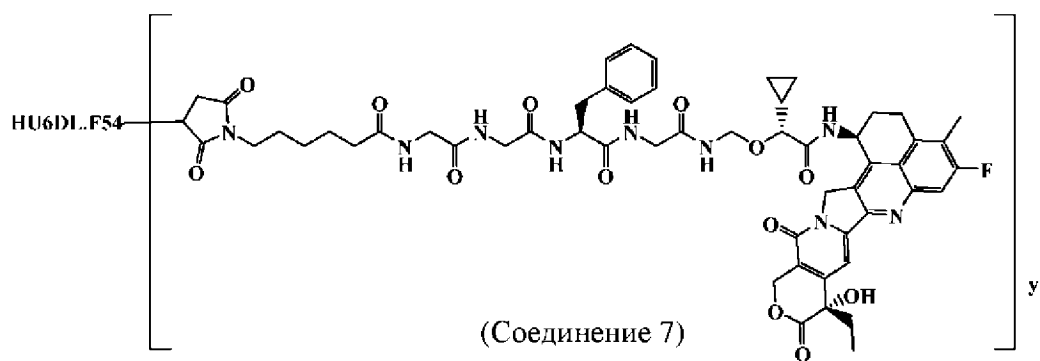
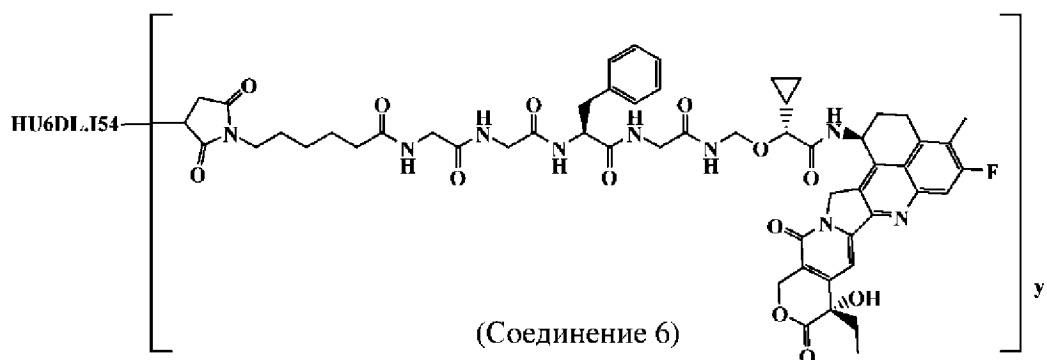
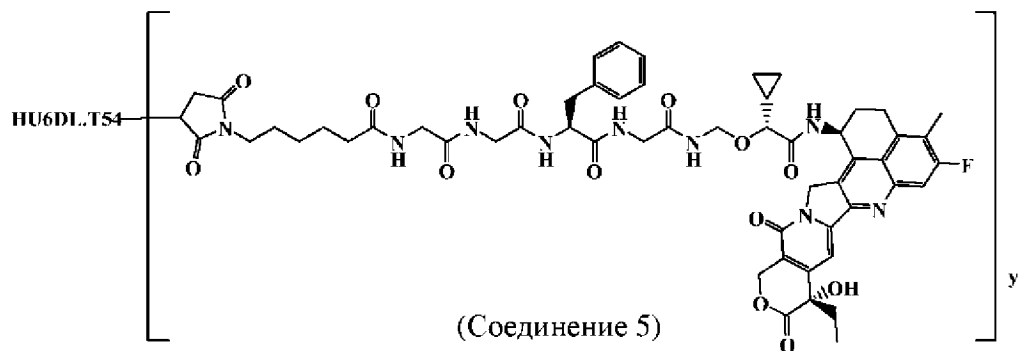
11. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по п. 10, где конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение выбраны из группы, состоящей из конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы (III) или его фармацевтически приемлемой соли или сольватного соединения:

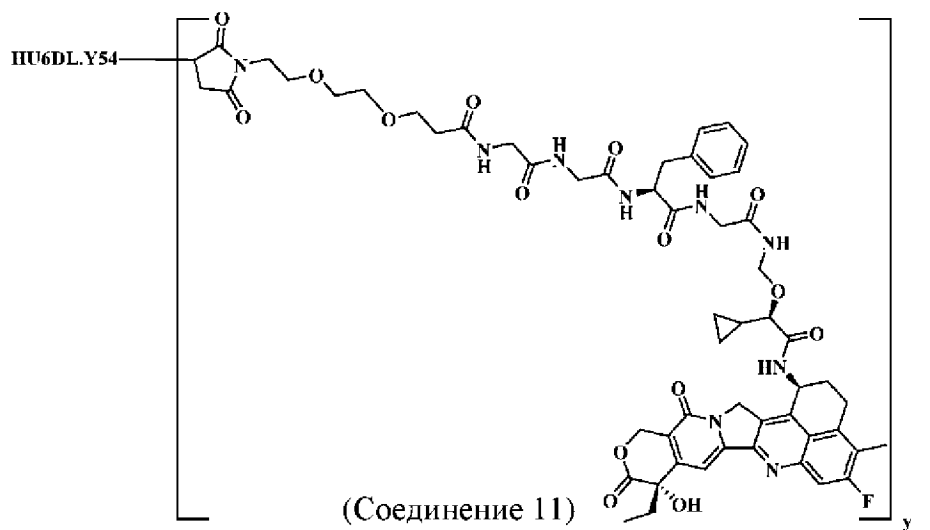
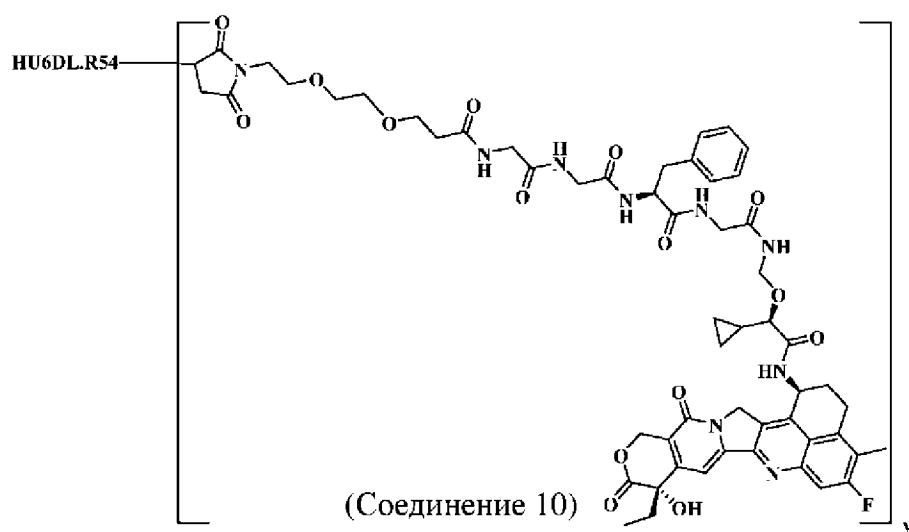
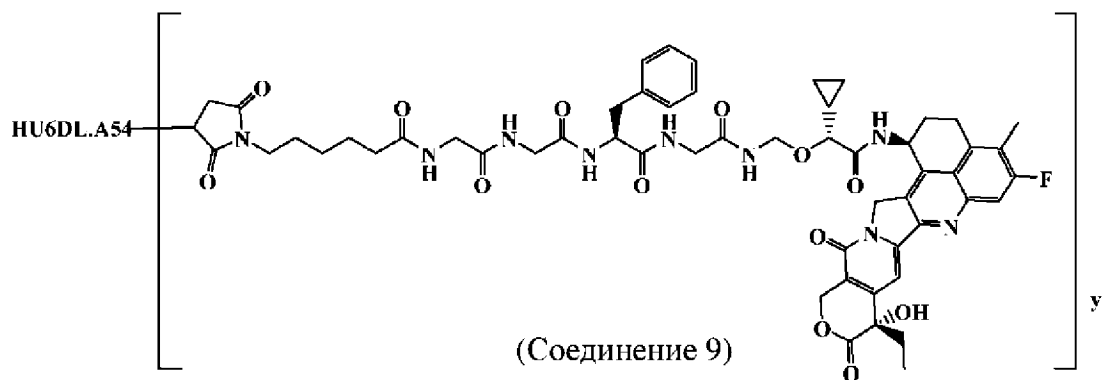


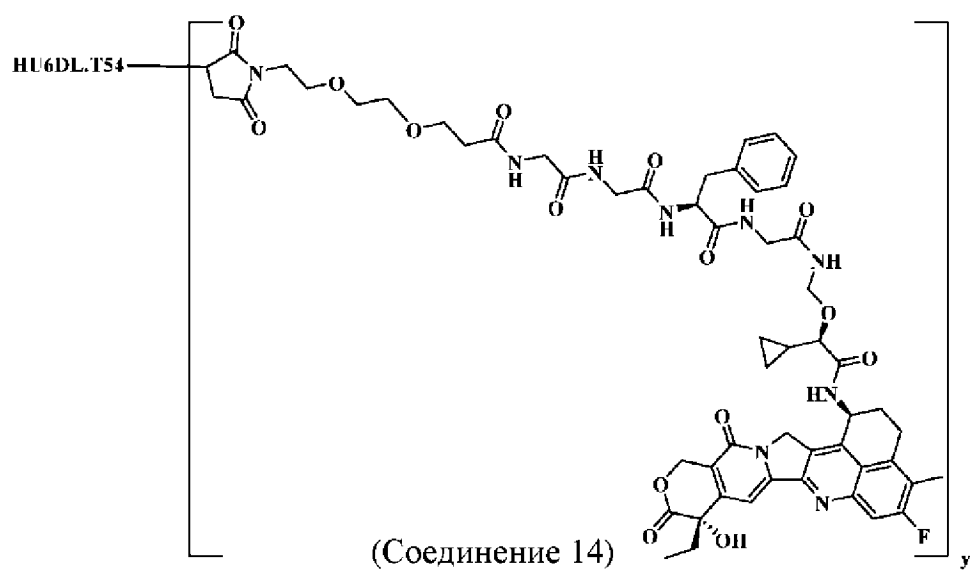
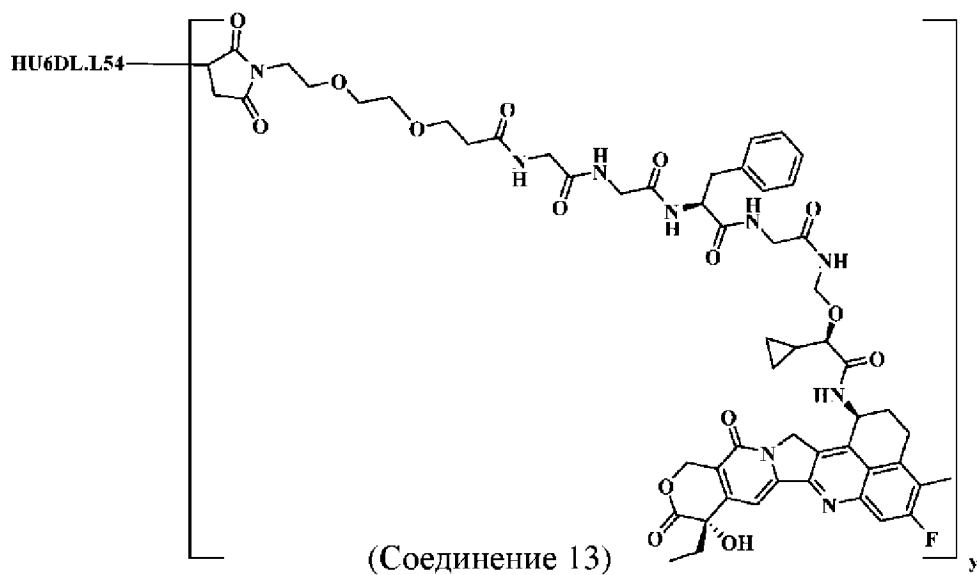
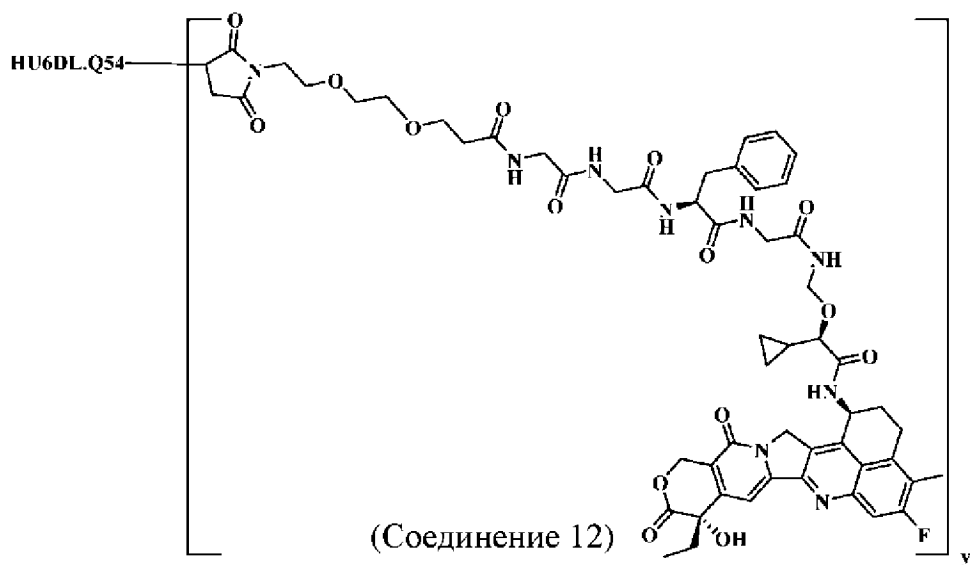
где y равен 1-10 и предпочтительно 4, 6, 8 или 10.

12. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение по п. 11, где конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольватное соединение выбрано из группы, состоящей из следующих структур:

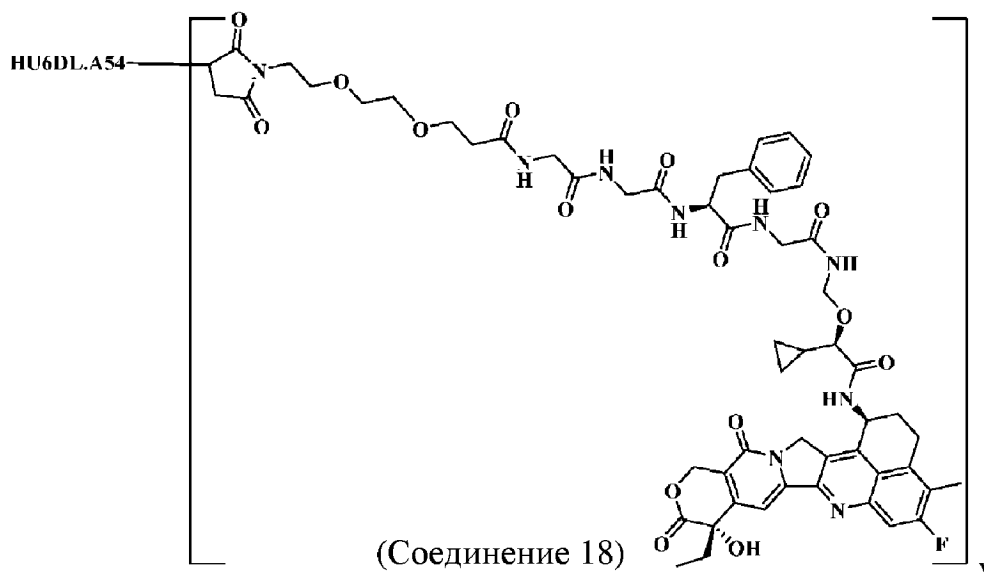






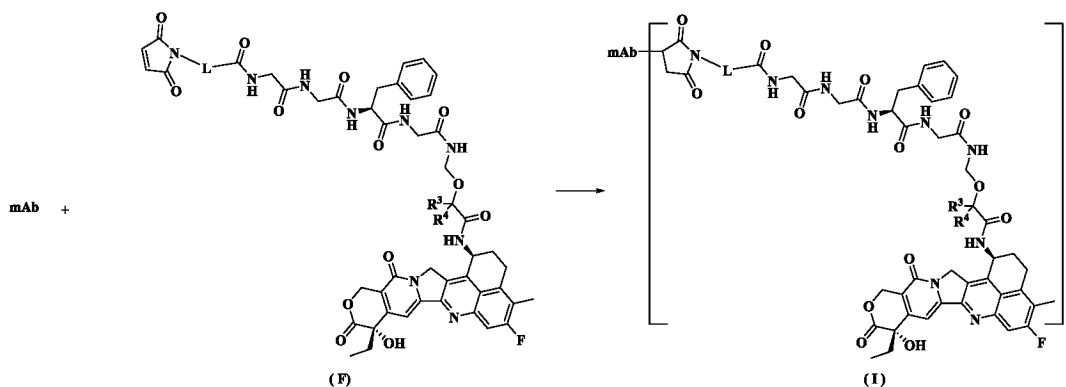






где  $y$  является таким, как определено в п. 1.

13. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли или сольватного соединения, включающий следующие стадии:



восстановление mAb и затем конъюгирование восстановленного mAb с соединением общей формулы (F) с получением соединения общей формулы (I), где  $L$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ , mAb и  $y$  являются такими, как определено в п. 1.

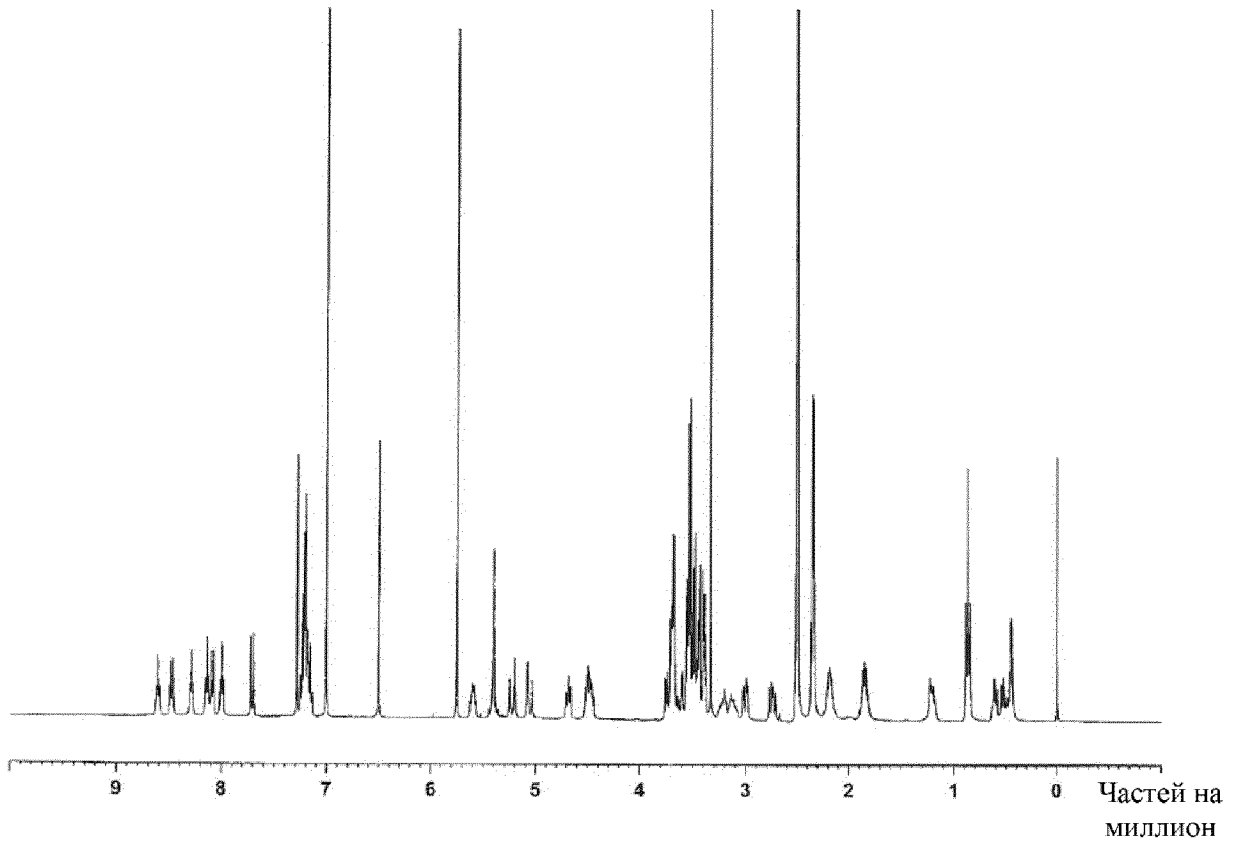
14. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемую соль или сольватное соединение по любому из п.п. 1-12 и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, разбавителей или носителей.

15. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли или сольватного соединения по любому из п.п. 1-12

или фармацевтической композиции по п. 14 для лечения заболевания или состояния, связанного с TROP-2.

16. Применение по п. 15, где заболевание, связанное с TROP-2 человека, представляет собой рак с высоким уровнем экспрессии TROP-2, и рак выбран из группы, состоящей из трижды негативного рака молочной железы, мелкоклеточного рака легкого, уротелиального рака, астроblastомы головного мозга человека, фарингеального рака человека, опухолей надпочечника, СПИД-ассоциированных раковых заболеваний, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитомы, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, метастатических опухолей головного мозга, рака молочной железы, опухоли каротидного тельца, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромофобной почечно-клеточной опухоли, светлоклеточной карциномы, рака толстой кишки, колоректального рака, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, опухоли Юинга, внескелетной миксоидной хондросаркомы, фиброзной дисплазии кости, остеофиброзной дисплазии, рака желчного пузыря или холангиокарциномы, рака желудка, гестационной трофобластической болезни, герминогенных опухолей, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, опухоли островковых клеток, саркомы Капоши, рака почки, лейкоза, липосаркомы, злокачественных липоматозных опухолей, рака печени, лимфомы, рака легкого, медуллоblastомы, меланомы, менингиомы, множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейроblastомы, нейроэндокринных опухолей, рака яичника, рака поджелудочной железы, папиллярного рака щитовидной железы, аденомы паращитовидной железы, рака у детей, опухолей оболочки периферического нерва, феохромоцитомы, опухолей гипофиза, рака предстательной железы, задней увеальной меланомы, метастатического рака почки, рабдоидных опухолей, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточной карциномы, синовиальной саркомы, рака яичка, рака тимуса, тимомы, метастатического рака щитовидной железы и рака матки.





**Фиг. 1**