

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390888** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.23

(22) Дата подачи заявки
2021.09.06

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛО ПРОТИВ НЕКТИНА-4, КОНЬЮГАТ, ВКЛЮЧАЮЩИЙ ЕГО, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202010972365.6; 202011624826.7

(32) 2020.09.16; 2020.12.31

(33) CN

(86) PCT/CN2021/116651

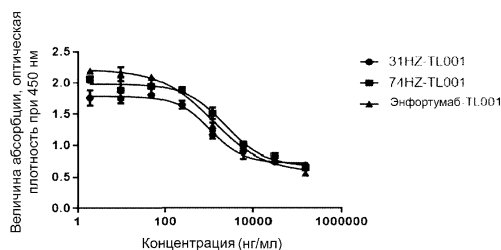
(87) WO 2022/057651 2022.03.24

(71) Заявитель:
**СЫЧУАНЬ КЭЛУНЬ-БАЙОТЕК
БАЙОФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД.
(CN)**

(72) Изобретатель:
**Ван Чэн, Лю Дэнянь, Ли Фэнь, Сяо
Лян, Сюэ Тунтун, Гэ Цзюнью, Ван
Цзини, Лю Лэ, Жэнь Ци (CN)**

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

(57) Предложены антитело против нектина-4 или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат, содержащий указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а также их применение в производстве лекарственного средства, в частности в производстве лекарственного средства для лечения и/или профилактики рака.



A1

202390888

202390888

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577616EA/019

АНТИТЕЛО ПРОТИВ НЕКТИНА-4, КОНЬЮГАТ, ВКЛЮЧАЮЩИЙ ЕГО, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

По настоящей заявке испрашивается приоритет по Китайской заявке № 202010972365.6, поданной 16 сентября 2020, и озаглавленной «Антитело против нектин-4, конъюгат, включающий его, и их применение», и по Китайской заявке № 202011624826.7, поданной 31 декабря 2020, и озаглавленной «Антитело против нектин-4, конъюгат, включающий его, и их применение», и содержание этих заявок включено в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области биомедицины. В частности, настоящее изобретение относится к антителу против нектин-4 и конъюгату, содержащему его, а также к их применению, в частности, для лечения и/или профилактики заболевания, связанного с нектином-4.

Предшествующий уровень техники

Нектин-4, принадлежащий к семейству нектиновых белков, также известному как PVRL, относящемуся к суперсемейству иммуноглобулинов, в основном опосредует кальций-независимую клеточную адгезию. Семейство нектин-4 включает представителей нектин-1, нектин-2, нектин-3 и нектин-4 с размером около 510-550 аминокислот и относится к трансмембранным белкам типа I, структура которых включает внеклеточный сегмент, образованный тремя Ig-подобными доменами, трансмембранную область и внутриклеточную хвостовую область. Три Ig-подобных домена включают один домен IgV и два домена IgC, а С-конец внутриклеточного домена имеет консервативную область, состоящую из Glu/Ala-X-Tyr-Val, которая используется для связывания домена PDZ белка афадина. Нектин-4 не имеет этой белковой последовательности, но он все же способен внутриклеточно связываться с белком афадином.

Нектин-4 может способствовать выживанию и пролиферации опухолевых клеток путем ингибирования апоптоза и активации сигнального пути PI3K-AKT. Исследования показали, что нектин-4 экспрессируется при раке желудка, гепатоцеллюлярной карциноме, немелкоклеточном раке легкого, раке мочевого пузыря, раке молочной железы, раке поджелудочной железы, раке яичников, раке головы и шеи, и раке пищевода, а также проявляет выраженную экспрессию при немелкоклеточном раке легкого, раке мочевого пузыря, раке молочной железы и раке поджелудочной железы. Высокая экспрессия нектин-4 в опухолях тесно связана с плохим прогнозом у пациентов. Таким образом, нектин-4 можно использовать в качестве идеальной мишени для разработки лекарственных средств против опухолей.

В настоящее время ADC (конъюгат антитела и лекарственного средства) Энфортумаб Ведотин (см., например, WO 2012/047724), нацеленный на нектин-4, уже доступен для лечения уротелиальной карциномы. Энфортумаб Ведотин представляет

собой конъюгированный с полностью человеческим антителом против нектина-4 препарат VC-MMAE со значением DAR (отношения лекарственного средства к антителу) 4. Клинические испытания фазы III показали, что 4 пациента достигли полной ремиссии (CR), 41 пациент достиг частичного ответа (PR), а частота объективных ответов (ORR) составила 41%; медиана OS (общей выживаемости) достигла 13,6 месяцев, медиана продолжительности ответа - 5,75 месяцев, медиана выживаемости без прогрессирования (PFS) - 5,4 месяцев. ORR составила 40% у 89 пациентов в группе лечения ингибитором контрольной точки, ORR составила 44% у 23 пациентов в группе, ранее не получавших ингибитор контрольной точки, и ORR составила 39% у 33 пациентов в группе с метастазами в печень. Энфортумаб Ведотин обладает превосходной противоопухолевой эффективностью.

Нектин-4 экспрессировался в плаценте, и экспрессия от слабого до умеренного уровня отмечена в некоторых нормальных тканях, таких как кожа, пищевод, молочная железа и мочевого пузыря. Основными клиническими токсическими и побочными эффектами Энфортумаба Ведотина были утомляемость (54%); побочные эффекты ≥ 3 степени: анемия (8%), гипонатриемия (7%), инфекция мочевыводящих путей (7%), гипергликемия (6%); у 4 пациентов были тяжелые побочные эффекты, связанные с приемом препарата, включая дыхательную недостаточность, обструкцию мочевыводящих путей, диабетический кетоацидоз и полиорганную недостаточность. Это свидетельствует, что токсические и побочные эффекты Энфортумаба Ведотина слишком серьезны.

Изложение сущности изобретения

В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связывают нектин-4, включающему:

(1a) следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:3, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:4 или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант; и/или следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант; или

(1b) следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:9, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:10, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант; и/или следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID

(3с) следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:47, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:48, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант; и/или следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант; или

следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:47, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:64, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант; и/или следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант; или

(3d) следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:49, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:50, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:51, или ее вариант; и/или следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:52, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:53, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант;

где вариант имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2 или 3 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит; предпочтительно замена является консервативной заменой.

В предпочтительных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат каркасную область, происходящую из человеческого или мышиногo иммуноглобулина.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату антитела, содержащему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению и по меньшей мере один терапевтический агент.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает химерный антигенный рецептор (CAR) и иммунную эффекторную клетку, экспрессирующую CAR.

В еще одном аспекте настоящее изобретение также относится к гибриднему белку, содержащему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению и дополнительный биологически активный полипептид.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела, иммунную эффекторную клетку, полиспецифическое антитело или слитый белок по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела, иммунной эффекторной клетки, полиспецифического антитела, гибридного белка или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в производстве лекарственного средства для лечения рака.

Настоящее изобретение также относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела, иммунной эффекторной клетки, полиспецифического антитела, гибридного белка или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для лечения и/или профилактики рака.

В другом общем аспекте настоящее изобретение также относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, где рак связан с нектином-4. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела, иммунной эффекторной клетки, полиспецифического антитела, гибридного белка или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Предпочтительно рак выбран из рака желудка, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака мочевого пузыря, уротелиального рака, рака уретры, рака почечной лоханки, рака мочеочника, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака протока молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака головы и шеи, рака толстой кишки, рака прямой кишки и рака пищевода.

Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения

Определения

В настоящем изобретении, если не указано иное, используемые здесь научные и технические термины имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области техники. Более того, термины, относящиеся к химии белков и нуклеиновых кислот, молекулярной биологии, культуре клеток и тканей, микробиологии, иммунологии и лабораторным процедурам, используемые в настоящей заявке, являются терминами и обычными процедурами, широко используемыми в соответствующих областях техники. Между тем, для лучшего понимания настоящего изобретения ниже приведены определения и пояснения соответствующих терминов.

Используемый в настоящей заявке термин «по меньшей мере один (вид)» или «один (вид) или несколько (видов)» может относиться к 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 (видам) или более.

Выражение «содержащий» или его эквиваленты «включающий» и «имеющий» и т.п. являются открытыми и не исключают дополнительные неуказанные элементы, этапы или компоненты. Выражение «состоящий из» исключает любой элемент, этап или компонент, который не указан. Выражение «состоящий по существу из» означает, что объем ограничен указанными элементами, этапами или компонентами, в дополнение к необязательным элементам, этапам или компонентам, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики заявленного объекта изобретения. Следует понимать, что выражение «содержащий» охватывает выражения «состоящий по существу из» и «состоящий из».

Термин «необязательный» или «при необходимости» означает, что описанное впоследствии событие или обстоятельство может произойти или не произойти, и что описание включает как наступление события или обстоятельства, так и отсутствие события или обстоятельства.

Используемый в настоящей заявке термин «полипептид» относится к полимеру, образованному двумя или более аминокислотами, связанными пептидными связями. «Белок» может быть образован за счет ковалентной или нековалентной связи между несколькими полипептидами или представлять собой один полипептид. Если не указано иное, термины «полипептид» и «белок» используются здесь взаимозаменяемо.

Используемый в настоящей заявке термин «антитело» относится к иммуноглобулину или его фрагменту, который специфически связывается с антигенным эпитопом по меньшей мере посредством одного сайта связывания антигена. В настоящей заявке определение антитела охватывает антигенсвязывающий фрагмент. Таким образом, термин «антитело» включает полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело), человеческое антитело, нечеловеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, однодоменное антитело и антигенсвязывающий фрагмент. Антитело может быть синтетическим (например, полученным химическим или биологическим связыванием), обработанным ферментами или полученным рекомбинантным путем. Антитело по настоящему изобретению включает любой тип иммуноглобулина (например, IgG, IgM, IgD, IgE, IgA и IgY), любой класс (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласс (например, IgG2a и IgG2b). В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой мышиное моноклональное антитело. В еще одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой гуманизированное моноклональное антитело.

Используемый в настоящей заявке термин «традиционное антитело» или «полноразмерное антитело» обычно включает четыре полипептида: две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC). Каждая легкая цепь содержит «вариабельную область легкой цепи (VL)» и «константную область легкой цепи (CL)» от N-конца к C-концу. Каждая

тяжелая цепь содержит «вариабельную область тяжелой цепи (VH)» и «константную область тяжелой цепи (CH)» от N-конца к С-концу. Константная область тяжелой цепи может включать CH1, CH2 и CH3 от N-конца к С-концу. В некоторых типах иммуноглобулинов (например, IgM и IgE) константная область тяжелой цепи может дополнительно содержать CH4. Фрагмент «Fc» относится к фрагменту, содержащему CH2 и CH3, который обеспечивает сайт связывания для рецептора Fc. «Шарнирная область» относится к части антитела, которая соединяет Fab- и Fc-фрагменты иммуноглобулина. В некоторых случаях шарнирная область относится к части Т-клеточного рецептора, которая соединяет константную область и трансмембранный домен. Здесь, при использовании в отношении химерного антигенного рецептора, шарнирная область может также относиться к любому функциональному эквиваленту. Специалисты в данной области техники могут судить о положениях VH, VL, CL, CH1, CH2, CH3 и шарнирной области в антителе в соответствии с известными алгоритмами и программным обеспечением, а описание применимых алгоритмов и программного обеспечения можно найти, например, в William R. Strohl, Lila M. Strohl, (2012), *Antibody structure-function relationships*, In Woodhead Publishing Series in Biomedicine, *Therapeutic Antibody Engineering*, Woodhead Publishing, pp. 37-56.

Как правило, каждая из VL и VH может содержать три гипервариабельных «определяющих комплементарность» области (CDRs) и четыре относительно консервативных «каркасных области (FRs)», которые соединены в последовательности FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 от N-конца к С-концу. В настоящей заявке CDRs вариабельной области легкой цепи (CDRL) могут обозначаться как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, а CDRs вариабельной области тяжелой цепи (CDRH) могут обозначаться как CDR-H1, CDR-H2. и CDR-H3. Обычно считается, что шесть CDRs в паре VH и VL могут определять специфичность связывания антигенсвязывающего сайта, но в некоторых случаях другие фрагменты (например, однодоменные антитела, также известные как нанотела), содержащие менее шести (например, три, четыре или пять) CDRs, также обладают антигенсвязывающей способностью. Специалист в данной области техники может идентифицировать CDRs, используя методы, хорошо известные в данной области техники, например, используя методы нумерации Kabat, Abm или Chothia. В этом контексте для одной и той же вариабельной области можно использовать несколько систем нумерации CDRs, например, Chothia, Abm, Kabat и IMGT. Специалистам в данной области будет понятно, что, хотя CDRs, определяемые различными системами нумерации, могут быть разными, CDRs, идентифицированные в одной и той же системе нумерации, представляют собой эффективные антигенсвязывающие сайты, способные связывать антигенные эпитопы. Описание систем нумерации CDRs можно найти, например, для системы нумерации Kabat: Kabat, E.A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; для системы нумерации Chothia: Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; или для системы нумерации IMGT: Lefranc, M.-P., 2011(6), IMGT, the International

ImMunoGeneTics Information System Cold Spring Harb Protoc.; для системы нумерации Abm: Martin, A.C.R. and J. Allen (2007) "Bioinformatics tools for antibody engineering," in S. Dübel (ed.), Handbook of Therapeutic Antibodies. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, pp. 95-118.

В настоящей заявке термины «каркасная область» и «каркас» используются взаимозаменяемо. Используемый в настоящей заявке термин остатки «каркасной области», «каркасная область» или «FR» относится к тем аминокислотным остаткам в варибельной области антитела, которые отличаются от остатков CDR, как определено выше.

Обычно считается, что фрагмент «Fv», состоящий из одной VH и одной VL за счет нековалентного взаимодействия, представляет собой наименьший антигенсвязывающий фрагмент, содержащий антигенсвязывающий сайт. Однако однодоменное антитело (VHH, также известное как sdAb или нанотело), содержащее только варибельную область тяжелой цепи, также может обладать антигенсвязывающей способностью. «Одноцепочечный Fv (scFv)» может быть получен путем связывания VH и VL через пептидный линкер. «Стабилизированный дисульфидной связью Fv (dsFv)» или «одноцепочечный стабилизированный дисульфидной связью Fv (scdsFv или dsscFv)» можно получить путем введения дисульфидной связи в Fv или scFv, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, например, конъюгат антитела, полиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент в CAR по настоящему изобретению предпочтительно использует scFv или scdsFv.

Используемый в настоящей заявке термин «Fab» включает одну полную варибельную область легкой цепи антитела (VL-CL) и тяжелой цепи антитела, и одну константную область тяжелой цепи (VH-CH1, также известную как Fd). Одноцепочечный «Fab (scFab)» может быть получен путем связывания CL и CH1 в «Fab» с помощью пептидного линкера. «F(ab')₂», по существу, включает два Fab-фрагмента, связанных дисульфидной связью в шарнирной области. «Fab'» представляет собой половину F(ab')₂, которую можно получить путем восстановления дисульфидной связи в шарнирной области F(ab')₂.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут быть «одновалентными», «двухвалентными», «трехвалентными» или «четыревалентными» или более, что означает, что они имеют множество (например, 1, 2, 3 или 4 или более) антигенсвязывающих участков.

Когда антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает два или более (например, 2, 3, 4, 5 или 6) антигена, его также можно назвать «полиспецифическим антителом», таким как биспецифическое антитело, триспецифическое или тетраспецифическое антитело, которые представляют собой полиспецифические антитела, способные связывать 2, 3 или 4 антигена, соответственно.

Используемый в настоящей заявке термин «диатело» относится к такому антителу, которое содержит два scFv с двумя антигенсвязывающими участками (двухвалентное), где VH и VL в каждом scFv связаны коротким пептидным линкером (примерно 5-10

аминокислотных остатков), так что цепи VH и VL спарены (т. е. спарены VH первого scFv и VL второго scFv, и спарены VL первого scFv и VH второго scFv) с образованием антигенсвязывающих участков. Диатело может представлять собой биспецифическое антитело.

Используемый в настоящей заявке термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к части полноразмерного антитела; он короче полноразмерного, но содержит по меньшей мере часть вариабельной области полноразмерного антитела (например, содержащую одну или несколько областей CDRs и/или один или несколько антигенсвязывающих участков), и, таким образом, сохраняет по меньшей мере частичную способность полноразмерного антитела специфически связывать антиген. Антигенсвязывающий фрагмент может включать, например, производное антитела, полученное путем ферментативной обработки полноразмерного антитела, производное, полученное синтетическим путем, или производное, полученное рекомбинантным путем. Примеры антигенсвязывающего фрагмента включают, без ограничения указанными, Fv, scFv, dsFv, scdsFv, Fab, scFab, Fab', F(ab')₂, диатело, фрагменты Fd и Fd' и другие фрагменты (например, фрагменты, содержащие модификацию). Антигенсвязывающий фрагмент может содержать несколько пептидных цепей, образованных, например, посредством соединения дисульфидными связями, и/или пептидными линкерами, и/или нековалентным взаимодействием.

Используемый в настоящей заявке термин «моноклональное антитело» относится к популяции высоко гомогенных антител, в которой молекулы антител, содержащиеся в ней, по существу идентичны, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональное антитело обычно специфически связывается с одним эпитопом. Моноклональное антитело, используемое в настоящем изобретении, может быть получено любым способом, известным в данной области техники, таким как получение из трансгенного животного (например, трансгенной мыши), получение из иммортализованной В-клетки (например, гибридомы В-клетки) или получение из бактериальных, эукариотических или растительных клеток с использованием метода рекомбинантных ДНК или выделения из фаговых библиотек антител. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой гуманизированное моноклональное антитело.

«Химерное антитело» относится к антителу, в котором часть (например, CDR, FR, вариабельная область, константная область или их комбинация) идентична или гомологична соответствующей последовательности антитела, происходящего из определенного вида, а оставшаяся часть идентична или гомологична соответствующей последовательности антитела, происходящего из другого вида. Используемый здесь термин «химерное антитело» также включает антитело, содержащее части, принадлежащие к разным классам или подклассам антител. В конкретном варианте

осуществления химерное антитело имеет вариабельную область мышиного антитела и константную область человеческого антитела.

Используемый в настоящей заявке термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, которое содержит последовательности нечеловеческого антитела и человеческого антитела. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой химерное антитело, которое содержит минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Нечеловеческое антитело может представлять собой антитело, полученное из любого вида, отличного от человека, или антитело, содержащее часть, полученную из вида, отличного от человека (например, химерное антитело). Нечеловеческие виды могут включать, например, мышь, крысу, кролика, альпаку или примата, отличного от человека. Технологии получения гуманизированного антитела из нечеловеческого антитела хорошо известны специалистам в данной области техники. Гуманизированное антитело может быть получено из нечеловеческого антитела (например, мышиного антитела или химерного антитела), например, путем прививки последовательности CDR нечеловеческого антитела (например, мышиного антитела) на каркасную область человеческого антитела. В некоторых случаях для сохранения антигенсвязывающей способности и/или стабильности гуманизированного антитела ключевые аминокислотные остатки каркасной последовательности нечеловеческого антитела (например, мышиного антитела) могут быть сохранены в каркасной области человеческого антитела, то есть осуществляют «обратную мутацию» (см., например, Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81(21): 6851-6855; Neuberger et al. (1984) Nature 312: 604-608).

Используемые в настоящей заявке термины «процент (%) идентичности последовательности», «идентичность последовательности» аминокислотной последовательности имеют значение, общепринятое в данной области техники, и относятся к процентной идентичности между двумя полипептидными последовательностями, определенной путем выравнивания последовательностей (например, с помощью проверки вручную или известного алгоритма). Ее можно определить с помощью способов, известных специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, Clustal Omega, FASTA.

«Аффинность» или «аффинность связывания» используют для измерения силы связывания между антителом и антигеном посредством нековалентного взаимодействия. Величину «аффинности» обычно можно представить как равновесную константу диссоциации K_D или EC_{50} . K_D можно рассчитать путем измерения равновесной константы ассоциации (k_a) и равновесной константы диссоциации (k_d): $K_D = k_d/k_a$. Аффинность можно определить с использованием обычных методов, известных в данной области техники, таких как биослойная интерферометрия (например, можно использовать систему детекции Octet Fortebio), радиоиммунный анализ, поверхностный плазмонный резонанс, иммуноферментный анализ или проточная цитометрия и т.п.

Используемый в настоящей заявке термин «специфическое связывание» между антителом и антигеном относится к связыванию между антителом и антигеном с высокой аффинностью. Как правило, значение K_D между антителом и антигеном, которые специфически связаны, составляет по меньшей мере примерно от 10^{-6} до 10^{-9} М или менее, например, по меньшей мере примерно 10^{-6} , по меньшей мере примерно 10^{-7} , по меньшей мере примерно 10^{-8} , по меньшей мере примерно 10^{-9} М или менее.

Как используется в настоящей заявке, аминокислотная последовательность «из» или «происходящая из» эталонной аминокислотной последовательности частично или полностью идентична или гомологична эталонной аминокислотной последовательности. Например, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи, полученная из иммуноглобулина человека, имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% по сравнению с последовательностью константной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека дикого типа, из которой она происходит.

Как используется в настоящей заявке, «вариант» полипептидной или аминокислотной последовательности имеет мутацию или модификацию одной или нескольких аминокислот по сравнению с полипептидной или аминокислотной последовательностью, из которой он происходит. Аминокислотная мутация включает замену, делецию или добавление аминокислот. Специалистам в данной области техники понятно, что аминокислота во вспомогательной области полипептида или белка может быть заменена соответствующей консервативной аминокислотой, которая обычно не изменяет ее биологическую активность (см., например, Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p. 224). Подходящие консервативные замены хорошо известны специалистам в данной области техники. Неограничивающие примеры некоторых распространенных консервативных замен аминокислотных остатков перечислены в таблице ниже. В некоторых случаях аминокислотные замены являются неконсервативными заменами. Специалистам в данной области техники будет понятно, что аминокислотная мутация или модификация могут быть произведены в антителе или фрагменте антитела для изменения его свойств, например, для изменения типа модификации гликозилирования антитела, для изменения способности к формированию межцепочечной дисульфидной связи или обеспечения активной группы конъюгата антитела. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие такую аминокислотную мутацию или модификацию, также входят в объем понятия «антитело или его антигенсвязывающий фрагмент» по настоящему изобретению.

Исходный остаток	Примерная консервативная замена	Предпочтительная замена
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln

Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Вал, Met, Ala, Phe	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Trp, Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val, Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala	Leu

Используемые в настоящей заявке термины «полинуклеотид», «нуклеиновая кислота» и «молекула нуклеиновой кислоты» относятся к олигомеру или полимеру, содержащему по меньшей мере два связанных нуклеотида или нуклеотидных производных, которые обычно могут включать дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновую кислоту (РНК).

Используемый в настоящей заявке термин «изолированный» означает, что материал (например, молекула нуклеиновой кислоты или полипептид) отделен от источника или среды, в которой он существует, то есть он практически не содержит каких-либо других компонентов.

Используемый в настоящей заявке термин «вектор» представляет собой носитель, используемый для введения экзогенной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин, и когда вектор трансформируется в подходящую клетку-хозяин, экзогенная нуклеиновая кислота амплифицируется или экспрессируется. Вектор обычно остается эписомальным, но его можно сконструировать для интеграции гена или его части в хромосому генома. Используемое здесь определение вектора включает плазмиду, линейаризованную плазмиду, вирусный вектор, космиду, фаговый вектор, фagemиду, искусственную хромосому (например, искусственную хромосому дрожжей и искусственную хромосому млекопитающего) и т.п.

Используемый в настоящей заявке термин «вектор экспрессии» относится к вектору, способному экспрессировать ДНК, при этом ДНК функционально связана с регуляторной последовательностью (например, промотором, сайтом связывания рибосомы), способной влиять на экспрессию ДНК. Регуляторная последовательность может содержать промоторную и терминаторную последовательности и при необходимости может содержать точку начала репликации, селективируемый маркер, энхансер, сигнал полиаденилирования и т.п. Вектор экспрессии может быть плазмидой, фаговым вектором, рекомбинантным вирусом или другим вектором, который при

введении в подходящую клетку-хозяин приводит к экспрессии клонированной ДНК. Подходящие векторы экспрессии хорошо известны специалистам в данной области техники и включают векторы экспрессии, которые реплицируются в эукариотических и/или прокариотических клетках, а также векторы экспрессии, которые остаются эписомальными, или векторы экспрессии, которые интегрируются в геном клетки-хозяина.

Используемый в настоящей заявке термин «клетка-хозяин» представляет собой клетку, используемую для получения, поддержания, репликации или амплификации вектора. Клетка-хозяин также может быть использована для экспрессии полипептида, который кодируется нуклеиновой кислотой или вектором. Клетка-хозяин может быть эукариотической клеткой или прокариотической клеткой.

Используемый в настоящей заявке термин «лечение» относится к облегчению заболевания/симптома, например, к уменьшению или устранению заболевания/симптома, к предупреждению или задержке возникновения, прогрессирования и/или ухудшения заболевания/симптома. Таким образом, лечение включает профилактику, лечение и/или излечение.

«Эффективное количество» относится к дозе, достаточной для уменьшения тяжести симптома заболевания, увеличения частоты и продолжительности бессимптомного периода заболевания или предотвращения повреждения или инвалидности вследствие перенесенного заболевания. «Эффективное количество» относится к количеству, необходимому для предотвращения, лечения, облегчения, замедления или частичного замедления заболевания или симптома. Например, для лечения опухоли «эффективное количество» антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела, иммунной эффекторной клетки или фармацевтической композиции по настоящему изобретению предпочтительно ингибирует рост опухолевых клеток или рост опухоли по меньшей мере примерно на 10%, предпочтительно по меньшей мере примерно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 30%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 40%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 50%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 60%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 70%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 80% по сравнению с не получавшими лечения субъектами. Эффективность ингибирования роста опухоли можно оценить с использованием обычных животных моделей опухолей, известных из уровня техники, таких как животные модели спонтанной опухоли, индуцированной опухоли и трансплантированной опухоли. Альтернативно, способность ингибировать рост клеток также может быть исследована с использованием анализов *in vitro*, хорошо известных в данной области техники. Эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела, иммунной эффекторной клетки или фармацевтической композиции по настоящему изобретению позволяет уменьшать размер опухоли или иным образом облегчать симптомы у субъекта (например, предотвращать и/или лечить метастазы или

рецидив). Специалисты в данной области техники могут определить эффективное количество на основе таких факторов, как возраст субъекта, физическое состояние, пол, тяжесть симптомов, конкретная композиция или путь введения и т.п. Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений.

Используемый в настоящей заявке термин «фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент» относится к носителю и/или эксципиенту, которые фармакологически и/или физиологически совместимы с субъектом и активным ингредиентом, хорошо известны в данной области техники (см. например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995) и включают, без ограничения указанными, агенты, регулирующие pH, поверхностно-активные вещества, адъюванты, агенты, повышающие ионную силу, разбавители, агенты для поддержания осмотического давления, вещества, замедляющие абсорбцию, консерванты. Например, агенты, регулирующие pH, включают фосфатный буфер, но не ограничиваются им. Поверхностно-активные вещества включают, без ограничения указанными, катионные, анионные или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween-80. Агенты, повышающие ионную силу, включают хлорид натрия, но не ограничиваются им. Консерванты включают, без ограничения указанными, различные антибактериальные и противогрибковые агенты, такие как парабен, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота и т.п. Агенты для поддержания осмотического давления включают сахар, NaCl и т.п., но не ограничиваются ими. Агенты для замедления абсорбции включают моностеаратную соль и желатин, но не ограничиваются ими. Разбавители включают воду, водный буфер (например, забуференный физиологический раствор), спирт и полиол (например, глицерин) и т.п., но не ограничиваются ими. Консерванты включают, без ограничения указанными, различные антибактериальные и противогрибковые агенты, такие как тимеросал, 2-феноксизтанол, парабен, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота и т.п. Стабилизирующие агенты имеют значение, обычно понятное специалистам в данной области техники, которые могут стабилизировать необходимую активность действующего ингредиента в лекарственном средстве, включая, без ограничения указанными, глутамат натрия, желатин, SPGA, сахара (например, сорбитол, маннитол, крахмал, сахарозу, лактозу, глюкан или глюкозу), аминокислоты (например, глутаминовую кислоту, глицин), белки (например, сухую сыворотку, альбумин или казеин) или продукты их разложения (например, гидролизат лактальбумина) и тому подобное.

Используемые в настоящей заявке примеры млекопитающих включают, без ограничения указанными, человека, приматов, отличных от человека, крысу, мышь, корову, лошадь, свинью, овцу, собаку, кошку и т.п. Используемый здесь термин «объект» относится к млекопитающему, такому, как человек. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой больного раком, человека или животное с подозрением на рак

или с риском развития рака. В настоящем описании термины «объект» и «субъект» используются взаимозаменяемо.

Антитела против нектина-4 или их антигенсвязывающие фрагменты

В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к антителу против нектина-4 или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически распознают нектин-4 и связываются с ним.

Нектин-4 может представлять собой белок, содержащий полную или частичную аминокислотную последовательность человеческого нектина-4 или нечеловеческого нектина-4. Предпочтительно нектин-4 представляет собой человеческий нектин-4. Нектин-4 человека может иметь аминокислотную последовательность, например, представленную под идентификационным номером (ID) Uniprot: Q96NY8-1. Нектин-4 нечеловеческого происхождения, например, может представлять собой нектин-4 млекопитающего, такой как нектин-4 примата яванского макака, не являющегося человеком, который может иметь аминокислотную последовательность, например, представленную под идентификационным номером (ID) Uniprot: L0N6D9. Нечеловеческий нектин-4, например, также может представлять собой крысиный нектин-4, который может иметь аминокислотную последовательность, например, представленную под идентификационным номером (ID) Uniprot: D3ZET1. Нечеловеческий нектин-4, например, также может представлять собой мышинный нектин-4, который может иметь аминокислотную последовательность, например, представленную под идентификационным номером (ID) Uniprot: Q8R007.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны специфически связываться с доменом IgV нектина-4. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны специфически связываться с доменом IgV человеческого нектина-4.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны специфически связываться с нектином-4 и блокировать его взаимодействие с нектином-1. В некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую 3 CDRs тяжелой цепи (CDRH): CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3. CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, выбраны из группы CDRH в Таблице 1.

Таблица 1: CDRs тяжелой цепи антитела против нектина-4

Система нумерации	Группа	CDR-H1 (SEQ ID NO:)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-H3 (SEQ ID NO:)
Chothia	a/e	GYTFTDY (3)	HPSDSE (4)	WDFRIYYAMDY (5)
	b	GYSITSDY (21)	SFSGR (22)	GNYDGFDY (23)
	c	GYFNSITSDY (18)	SFSGR (22)	GNYDGFDY (23)
	d/f	GYTFINY (39)	HPSDSA (40)	WGNFYTVNAWY YFDY (41)
Abm	a/e	GYTFTDYWMN (9)	MIHPSDSETR (10)	WDFRIYYAMDY (5)

	b	GYSITSDYDWH (27)	YISFSGRTY (28)	GNYDGFDDY (23)
	c	GYFNSITSDYDWH (36)	YISFSGRTY (28)	GNYDGFDDY (23)
	d/f	GYTFINYWMN (45)	MIHPSDSATR (46)	WGNFYTVNAWY YFDY (41)
Kabat	a	DYWMN (11)	MIHPDSETRLNQKFKD (12)	WDFRIYYAMDY (5)
	b	SDYDWH (29)	YISFSGRTYYNPSLKS (30)	GNYDGFDDY (23)
	c	ITSDYDWH (44)	YISFSGRTYYNPSLKS (30)	GNYDGFDDY (23)
	d	NYWMN (47)	MIHPSDSATRLNQKFKD (48)	WGNFYTVNAWY YFDY (41)
	e	DYWMN (11)	MIHPDSETRLNQKFQG (63)	WDFRIYYAMDY (5)
	f	NYWMN (47)	MIHPSDSATRLNQSFQG (64)	WGNFYTVNAWY YFDY (41)
IMGT	a/e	GYTFTDYW (13)	IHPDSET (14)	ARWDFRIYYAM DY (15)
	b	GYSITSDYD (31)	ISFSGRT (32)	ARGNYDGFDDY (33)
	c	GYFNSITSDYD (54)	ISFSGRT (32)	ARGNYDGFDDY (33)
	d/f	GYTFINYW (49)	IHPSDSAT (50)	ARWGNFYTVNA WYYFDY (51)

В некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 включает переменную область легкой цепи (VL), содержащую 3 CDRs легкой цепи (CDRL): CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3. CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбраны из группы CDRL в Таблице 2.

Таблица 2: CDRs легкой цепи антитела против нектина-4

Система нумерации	Группа	CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)	CDR-L3 (SEQ ID NO:)
Chothia	a/e	KSSQSLLNTNSQKNYLA (6)	FASTRES (7)	QQHYSTPLT (8)
	b/c	RASQNIGTSIH (24)	FASESIS (25)	QQSKSWPTYT (26)
	d/f	KSSQTLLNSNTQKNYLA (42)	FASTRES (43)	QQHYSTPLT (8)
Abm	a/e	KSSQSLLNTNSQKNYLA (6)	FASTRES (7)	QQHYSTPLT (8)
	b/c	RASQNIGTSIH (24)	FASESIS (25)	QQSKSWPTYT (26)
	d/f	KSSQTLLNSNTQKNYLA (42)	FASTRES (43)	QQHYSTPLT (8)
Kabat	a/e	KSSQSLLNTNSQKNYLA (6)	FASTRES (7)	QQHYSTPLT (8)
	b/c	RASQNIGTSIH (24)	FASESIS (25)	QQSKSWPTYT (26)
	d/f	KSSQTLLNSNTQKNYLA (42)	FASTRES (43)	QQHYSTPLT (8)
IMGT	a/e	QSLNTNSQKNY (16)	FAS (17)	QQHYSTPLT (8)
	b/c	QNIGTS (34)	FAS (35)	QQSKSWPTYT (26)
	d/f	QTLLNSNTQKNY (52)	FAS (53)	QQHYSTPLT (8)

Гипервариабельные области (CDRs)

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:3

или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:4, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6 или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:9 или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:10, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:11, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:12 или 63, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:14,

или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:15, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:16, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, или ее вариант, и CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант.

В конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают:

(a) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:3, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:4 или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант; или

(b) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:9, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:10, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант; или

(c) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:11, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:12 или 63, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант; или

(d) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:14, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:15, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:16, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в

SEQ ID NO:17, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант, и CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:27, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:28, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант, и CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:29, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:30, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25,

или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:31, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:32, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:33, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:34, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант.

В конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают:

(a) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант; или

(b) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:27, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:28, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант; или

(c) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:29, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:30, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в

SEQ ID NO:25, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант; или

(d) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:31, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:32, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:33, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:34, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант, и CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:28, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант, и CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:44,

или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:30, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант, и CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:54, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:32, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:33, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, дополнительно включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:34, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, или ее вариант, и CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант.

В конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают:

(a) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант; или

(b) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:28, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант; или

(с) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:44, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:30, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант; или

(д) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:54, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:32, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:33, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:34, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:39, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:40, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43, или ее вариант, и CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:45, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:46, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43,

или ее вариант, и CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:47, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:48 или 64, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43, или ее вариант, и CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:49, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:50, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:51, или ее вариант. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:52, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:53, или ее вариант, и CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант.

В конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают:

(a) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:39, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:40, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант; или

(b) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Abm: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ

ID NO:45, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:46, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант; или

(с) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:47, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:48 или 64, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант; или

(d) следующие шесть CDRs тяжелых и легких цепей, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:49, или ее вариант, CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:50, или ее вариант, CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:51, или ее вариант, CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:52, или ее вариант, CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:53, или ее вариант, CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант.

В некоторых вариантах осуществления антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с нектином-4, как описано выше, вариант имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью, из которой он происходит, или имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2 или 3 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит; предпочтительно замена является консервативной заменой.

Каркасная область (FR)

В некоторых вариантах осуществления VH дополнительно содержит каркасную область тяжелой цепи (FR). В других вариантах осуществления VL дополнительно содержит каркасную область легкой цепи (FR). Каждая из каркасной области тяжелой цепи и/или каркасной области легкой цепи может независимо происходить из каркасных областей иммуноглобулина любого вида. Предпочтительно каркасная область тяжелой цепи и каркасная область легкой цепи, каждая независимо, происходят из каркасной области тяжелой цепи и каркасной области легкой цепи человеческого или мышинного

иммуноглобулина. В одном варианте осуществления каркасная область тяжелой цепи и каркасная область легкой цепи, каждая независимо, содержат каркасную область тяжелой цепи и каркасную область легкой цепи, происходящие из мышинового иммуноглобулина, каркасную область тяжелой цепи и каркасную область легкой цепи иммуноглобулина человека или аминокислотные последовательности, происходящие из их комбинаций. В одном варианте осуществления каркасная область тяжелой цепи и каркасная область легкой цепи, каждая независимо, содержат аминокислотные последовательности, происходящие из каркасной области тяжелой цепи и каркасной области легкой цепи антитела зародышевой линии человека.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления VH антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению содержит каркасную область тяжелой цепи, происходящую из иммуноглобулина человека, и/или VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит каркасную область легкой цепи, происходящую из человеческого иммуноглобулина. Соответственно, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению являются гуманизированными. В таких вариантах осуществления каркасная область тяжелой цепи и/или каркасная область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может содержать один или несколько нечеловеческих (например, мышинных) аминокислотных остатков, например, каркасная область тяжелой цепи и/или каркасная область легкой цепи могут содержать одну или несколько обратных мутаций аминокислот, и в этих обратных мутациях присутствуют соответствующие мышинные аминокислотные остатки.

В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, или ее вариант. В еще одном предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:2, или ее вариант.

В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, или ее вариант, и VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:2 или ее вариант.

В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:55, или ее вариант. В еще одном предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с нектином-4, включают VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:56, или ее вариант.

В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4,

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включают VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:59, или ее вариант, и VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:60, или ее вариант.

В конкретных вариантах осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают:

(1) VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:2, или ее вариант; или

(2) VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:20, или ее вариант; или

(3) VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, или ее вариант; или

(4) VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:55, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:56, или ее вариант; или

(5) VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:57, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:58, или ее вариант; или

(6) VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:59, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:60, или ее вариант.

В одном варианте осуществления, как описано выше, вариант имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью, из которой он происходит. Альтернативно, вариант имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. Предпочтительно замена представляет собой консервативную замену.

Константная область

В некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 дополнительно содержит константную область тяжелой цепи. В другом варианте осуществления антитело против нектина-4 дополнительно содержит константную область легкой цепи. Каждая из константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи может быть независимо получена из константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи иммуноглобулина любого вида. В предпочтительном варианте константная область тяжелой цепи и константная область легкой цепи, каждая независимо, происходят из константной области тяжелой цепи или ее варианта и константной области легкой цепи или ее варианта мышинового иммуноглобулина. В более предпочтительном варианте константная область тяжелой цепи и константная область легкой цепи, каждая независимо, происходят из константной области тяжелой цепи или ее варианта и константной области легкой цепи или ее варианта иммуноглобулина человека. Вариант

имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление до 20, до 15, до 10 или до 5 аминокислот; например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью дикого типа, из которой он происходит.

Константная область тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность, выбранную по меньшей мере из части шарнирной области, CH1, CH2, CH3 или их комбинации. В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи включает CH1. В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи включает CH1-шарнирную область-CH2. В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи включает CH1-шарнирную область-CH2-CH3. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи дополнительно содержит CH4. Константная область тяжелой цепи может быть получена из константной области тяжелой цепи иммуноглобулина любого подтипа (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, и IgA2), или любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b), или их комбинации. Предпочтительно константная область тяжелой цепи происходит из константной области тяжелой цепи IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). В предпочтительном варианте осуществления константная область тяжелой цепи происходит из константной области тяжелой цепи IgG1 человека.

Константная область легкой цепи может быть получена из константной области легкой цепи λ (лямбда) или из константной области легкой цепи κ (каппа). В предпочтительном варианте осуществления константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи κ человека.

В конкретном варианте осуществления константная область тяжелой цепи содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, или ее вариант. В конкретном варианте осуществления константная область легкой цепи содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:62, или ее вариант. В этих вариантах осуществления вариант имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью, из которой он происходит. Альтернативно вариант имеет консервативную замену до 20 аминокислот (например, консервативную замену до 15, до 10 или до 5 аминокислот; например, консервативную замену 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит.

В конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают тяжелую цепь и легкую цепь, где:

(а) тяжелая цепь содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, или ее вариант, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, или ее вариант, а легкая цепь содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:2, или ее вариант, и

константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62, или ее вариант; или

(b) тяжелая цепь содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, или ее вариант, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, или ее вариант, а легкая цепь содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:20, или ее вариант, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62, или ее вариант; или

(c) тяжелая цепь содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, или ее вариант, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, или ее вариант, а легкая цепь содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, или ее вариант, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62, или ее вариант; или

(d) тяжелая цепь содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:55, или ее вариант, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, или ее вариант, а легкая цепь содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:56, или ее вариант, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62, или ее вариант; или

(e) тяжелая цепь содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:57, или ее вариант, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, или ее вариант, а легкая цепь содержит: VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:58, или ее вариант, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62, или ее вариант; или

(f) тяжелая цепь содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:59, или ее вариант, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, или ее вариант, а легкая цепь содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:60, или ее вариант, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62, или ее вариант.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv-фрагмента, Fv, стабилизированного дисульфидной связью (dsFv), диатела, биспецифического антитела и полиспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой мышинное, химерное или гуманизированное антитело.

Мышиное антитело

В одном варианте осуществления антитело против нектина-4 по настоящему изобретению представляет собой мышинное антитело, которое включает VH и VL, где VH содержит CDR тяжелой цепи и каркасную область тяжелой цепи, как описано выше, а VL содержит CDR легкой цепи и каркасную область легкой цепи, как описано выше, где каркасная область тяжелой цепи и каркасная область легкой цепи, каждая независимо, содержат аминокислотные последовательности, происходящие из каркасной области мышинового иммуноглобулина. В одном варианте осуществления антитело против нектина-4 по настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело, полученное из мышинной гибридомной клетки.

В конкретном варианте осуществления мышинное антитело включает VH, которая содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, как описано в Группе «а» в Таблице 1, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области мышинового иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления мышинное антитело включает VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, или ее вариант. В еще одном конкретном варианте осуществления мышинное антитело дополнительно включает VL, которая содержит CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, как описано в Группе «а» в Таблице 2, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области мышинового иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления мышинное антитело содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:2, или ее вариант.

В другом конкретном варианте осуществления мышинное антитело включает VH, которая содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, как описано в Группе «b» в Таблице 1, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области мышинового иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления мышинное антитело содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, или ее вариант. В еще одном конкретном варианте осуществления мышинное антитело дополнительно включает VL, которая содержит CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, как описано в Группе «b» в Таблице 2, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области мышинового иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления мышинное антитело содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:20, или ее вариант.

В еще одном конкретном варианте осуществления мышинное антитело включает VH, которая содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, как описано в Группе «с» в Таблице 1, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области мышинового иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления мышинное антитело содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, или ее вариант. В еще одном конкретном варианте осуществления мышинное антитело дополнительно включает VL, которая

содержит CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, как описано в Группе «с» в Таблице 2, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области мышинового иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления мышинное антитело содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, или ее вариант.

В варианте осуществления, как описано выше, вариант имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью, из которой он происходит. Альтернативно, вариант имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. Предпочтительно замена представляет собой консервативную замену.

В конкретном варианте осуществления мышинное антитело содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, и VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:2.

В другом конкретном варианте осуществления мышинное антитело содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:20.

В еще одном конкретном варианте осуществления мышинное антитело содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, и VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:38.

Химерное антитело

В одном варианте осуществления антитело против нектин-4 по настоящему изобретению представляет собой химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит CDR тяжелой цепи и/или CDR легкой цепи мышинового антитела, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи мышинового антитела, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи мышинового антитела, как описано выше, и константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи, где константная область тяжелой цепи происходит из константной области тяжелой цепи не-мышинового иммуноглобулина, и/или константная область легкой цепи происходит из константной области легкой цепи не-мышинового иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления константная область тяжелой цепи происходит из константной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека, и/или константная область легкой цепи происходит из константной области легкой цепи иммуноглобулина человека. В предпочтительном варианте осуществления константная

область тяжелой цепи происходит из константной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека, а константная область легкой цепи происходит из константной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 мышинового антитела, как описано в Группе «а» в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело дополнительно содержит CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 мышинового антитела, как описано в Группе «а» в Таблице 2.

В конкретном варианте осуществления химерное антитело содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, или ее вариант. В конкретном варианте осуществления химерное антитело дополнительно содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:2, или ее вариант.

В другом конкретном варианте осуществления химерное антитело содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, или ее вариант. В конкретном варианте осуществления химерное антитело дополнительно содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:20, или ее вариант.

В еще одном конкретном варианте осуществления химерное антитело содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, или ее вариант. В конкретном варианте осуществления химерное антитело дополнительно содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, или ее вариант.

В одном варианте осуществления, как описано выше, вариант имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью, из которой он происходит. Альтернативно вариант имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. Предпочтительно замена представляет собой консервативную замену.

В некоторых вариантах осуществления химерное антитело, как описано выше, дополнительно содержит константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. В предпочтительном варианте осуществления константная область тяжелой цепи происходит из константной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека, а константная область легкой цепи происходит из константной области легкой цепи иммуноглобулина человека. В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи происходит из константной области тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи происходит из константной области тяжелой цепи IgG1 человека. В одном варианте осуществления константная область легкой цепи происходит из константной области λ -или κ -легкой цепи человека. В одном варианте осуществления константная область легкой цепи происходит из константной области легкой цепи κ человека. В конкретном варианте

осуществления константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, или ее вариант. В конкретном варианте осуществления константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:62, или ее вариант. В этих вариантах осуществления вариант имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью, из которой он происходит. Альтернативно, вариант имеет консервативную замену до 20 аминокислот (например, консервативную замену до 15, до 10 или до 5 аминокислот; например, консервативную замену 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит.

В конкретном варианте осуществления химерное антитело включает тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, легкая цепь содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:2, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62.

В другом конкретном варианте осуществления химерное антитело включает тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, а легкая цепь содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:20, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62.

В еще одном конкретном варианте осуществления химерное антитело включает тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, а легкая цепь содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62.

Гуманизированное антитело

В одном варианте осуществления антитело против нектин-4 по настоящему изобретению представляет собой гуманизированное антитело, которое включает VH и VL, где VH содержит описанные выше CDRs тяжелой цепи и каркасную область тяжелой цепи, а VL содержит описанные выше CDRs легкой цепи и каркасную область легкой цепи, где каждая из каркасной области тяжелой цепи и каркасной области легкой цепи независимо содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи и каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека. В таких вариантах осуществления каркасная область тяжелой цепи и/или каркасная область легкой цепи могут содержать один или несколько нечеловеческих (например, мышинных)

аминокислотных остатков, например, каркасная область тяжелой цепи и/или каркасная область легкой цепи может включать одну или несколько обратных аминокислотных мутаций, и в этих обратных мутациях присутствуют соответствующие мышинные аминокислотные остатки. Гуманизированное антитело может быть получено из нечеловеческого антитела (например, мышинового или химерного антитела). В одном варианте осуществления гуманизированное антитело происходит из мышинового антитела против нектин-4 по настоящему изобретению, как описано в примерах по настоящему изобретению.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает CDR-H1 или ее вариант, CDR-H2 или ее вариант, CDR-H3 или ее вариант из мышинового антитела, как описано выше. В конкретном варианте гуманизированное антитело дополнительно включает CDR-L1 или ее вариант, CDR-L2 или ее вариант, CDR-L3 или ее вариант из мышинового антитела, как описано выше.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает VH, которая содержит CDR-H1 или ее вариант, CDR-H2 или ее вариант, CDR-H3 или ее вариант из мышинового антитела, как описано выше, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В еще одном конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело дополнительно включает VL, которая содержит CDR-L1 или ее вариант, CDR-L2 или ее вариант, CDR-L3 или ее вариант из мышинового антитела, как описано выше, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает VH, как определено в соответствии с системой нумерации Chothia, которая содержит CDR-H1, как указано в SEQ ID NO:3, CDR-H2, как указано в SEQ ID NO:4, CDR-H3, как указано в SEQ ID NO:5, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В еще одном конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело дополнительно включает VL, как определено в соответствии с системой нумерации Chothia, которая содержит CDR-L1, как указано в SEQ ID NO:6, CDR-L2, как указано в SEQ ID NO:7, CDR-L3, как указано в SEQ ID NO:8, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает VH, как определено в соответствии с системой нумерации Abm, которая содержит CDR-H1, как указано в SEQ ID NO:9, CDR-H2, как указано в SEQ ID NO:10, CDR-H3, как указано в SEQ ID NO:5, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В еще одном конкретном варианте осуществления

гуманизированное антитело дополнительно включает VL, как определено в соответствии с системой нумерации Abm, которая содержит CDR-L1, как указано в SEQ ID NO:6, CDR-L2, как указано в SEQ ID NO:7, CDR-L3, как указано в SEQ ID NO:8, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает VH, как определено в соответствии с системой нумерации Kabat, которая содержит CDR-H1, как указано в SEQ ID NO:11, CDR-H2, как указано в SEQ ID NO:12 или 63, CDR-H3, как указано в SEQ ID NO:5, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В еще одном конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело дополнительно включает VL, как определено в соответствии с системой нумерации Kabat, которая содержит CDR-L1, как указано в SEQ ID NO:6, CDR-L2, как указано в SEQ ID NO:7, CDR-L3, как указано в SEQ ID NO:8, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело содержит VH, как определено в соответствии с системой нумерации IMGT, которая включает CDR-H1, как указано в SEQ ID NO:13, CDR-H2, как указано в SEQ ID NO:14, CDR-H3, как указано в ID NO:15, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В еще одном конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело дополнительно включает VL, как определено в соответствии с системой нумерации IMGT, которая содержит CDR-L1, как указано в SEQ ID NO:16, CDR-L2, как указано в SEQ ID NO:17, CDR-L3, как указано в SEQ ID NO:8, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:56, или ее вариант. В одном варианте осуществления гуманизированное антитело содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:55, или ее вариант.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает VH, как определено в соответствии с системой нумерации Chothia, которая содержит CDR-H1, как указано в SEQ ID NO:21 или 18, CDR-H2, как указано в SEQ ID NO:22, CDR-H3, как указано в SEQ ID NO:23, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В еще одном конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело дополнительно включает VL, как определено в соответствии с системой нумерации Chothia, которая содержит CDR-L1, как указано в SEQ ID NO:24, CDR-L2, как указано в SEQ ID NO:25, CDR-L3, как указано в SEQ ID NO:26, и каркасную

область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает VH, как определено в соответствии с системой нумерации Abm, которая содержит CDR-H1, как указано в SEQ ID NO:27 или 36, CDR-H2, как указано в SEQ ID NO:28, CDR-H3, как указано в SEQ ID NO:23, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В еще одном конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело дополнительно включает VL, как определено в соответствии с системой нумерации Abm, которая содержит CDR-L1, как указано в SEQ ID NO:24, CDR-L2, как указано в SEQ ID NO:25, CDR-L3, как указано в SEQ ID NO:26, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает VH, как определено в соответствии с системой нумерации Kabat, которая содержит CDR-H1, как указано в SEQ ID NO:29 или 44, CDR-H2, как указано в SEQ ID NO:30, CDR-H3, как указано в SEQ ID NO:23, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В еще одном конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело дополнительно включает VL, как определено в соответствии с системой нумерации Kabat, которая содержит CDR-L1, как указано в SEQ ID NO:24, CDR-L2, как указано в SEQ ID NO:25, CDR-L3, как указано в SEQ ID NO:26, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает VH, как определено в соответствии с системой нумерации IMGT, которая содержит CDR-H1, как указано в SEQ ID NO:31 или 54, CDR-H2, как указано в SEQ ID NO:32, CDR-H3, как указано в SEQ ID NO:33, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В еще одном конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело дополнительно включает VL, как определено в соответствии с системой нумерации IMGT, которая содержит CDR-L1, как указано в SEQ ID NO:34, CDR-L2, как указано в SEQ ID NO:35, CDR-L3, как указано в SEQ ID NO:26, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:58, или ее вариант. В одном варианте осуществления гуманизированное антитело содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:57, или ее вариант.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает VH, как определено в соответствии с системой нумерации Chothia, которая содержит CDR-H1, как указано в SEQ ID NO:39, CDR-H2, как указано в SEQ ID NO:40, CDR-H3, как указано в SEQ ID NO:41, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В еще одном конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело дополнительно включает VL, как определено в соответствии с системой нумерации Chothia, которая содержит CDR-L1, как указано в SEQ ID NO:42, CDR-L2, как указано в SEQ ID NO:43, CDR-L3, как указано в SEQ ID NO:8, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает VH, как определено в соответствии с системой нумерации Abm, которая содержит CDR-H1, как указано в SEQ ID NO:45, CDR-H2, как указано в SEQ ID NO:46, CDR-H3, как указано в SEQ ID NO:41, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В еще одном конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело дополнительно включает VL, как определено в соответствии с системой нумерации Abm, которая содержит CDR-L1, как указано в SEQ ID NO:42, CDR-L2, как указано в SEQ ID NO:43, CDR-L3, как указано в SEQ ID NO:8, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает VH, как определено в соответствии с системой нумерации Kabat, которая содержит CDR-H1, как указано в SEQ ID NO:47, CDR-H2, как указано в SEQ ID NO:48 или 64, CDR-H3, как указано в SEQ ID NO:41, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В еще одном конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело дополнительно включает VL, как определено в соответствии с системой нумерации Kabat, которая содержит CDR-L1, как указано в SEQ ID NO:42, CDR-L2, как указано в SEQ ID NO:43, CDR-L3, как указано в SEQ ID NO:8, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает VH, как определено в соответствии с системой нумерации IMGT, которая содержит CDR-H1, как указано в SEQ ID NO:49, CDR-H2, как указано в SEQ ID NO:50, CDR-H3, как указано в SEQ ID NO:51, и каркасную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В еще одном конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело дополнительно включает VL, как определено в соответствии

с системой нумерации IMGT, которая содержит CDR-L1, как указано в SEQ ID NO:52, CDR-L2, как указано в SEQ ID NO:53, CDR-L3, как указано в SEQ ID NO:8, и каркасную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, происходящую из каркасной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

В одном варианте осуществления гуманизованное антитело содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:60, или ее вариант. В одном варианте осуществления гуманизованное антитело содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:59, или ее вариант.

В одном варианте осуществления, как описано выше, вариант имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью, из которой он происходит. Альтернативно, вариант имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит. Предпочтительно замена представляет собой консервативную замену.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению включают переменную область тяжелой цепи (VH) и/или переменную область легкой цепи (VL), где по сравнению с переменной областью тяжелой цепи и/или переменной областью легкой цепи описанного выше гуманизованного антитела, по меньшей мере одна CDR и/или каркасная область содержит аминокислотную мутацию, представляющую собой замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот или любую их комбинацию (например, замену, делецию или добавление 1, 2 или 3 аминокислот или любую их комбинацию). Предпочтительно замена представляет собой консервативную замену.

В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против нектин-4 дополнительно содержит константную область тяжелой цепи. В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи происходит из константной области тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи происходит из константной области тяжелой цепи IgG1 человека. В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, или ее вариант.

В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против нектин-4 дополнительно содержит константную область легкой цепи. В одном варианте осуществления константная область легкой цепи происходит из константной области λ -или κ -легкой цепи человека. В одном варианте осуществления константная область легкой цепи происходит из константной области κ -легкой цепи человека. В одном варианте

осуществления константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:62, или ее вариант.

В одном варианте осуществления, как описано выше, вариант имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью, из которой он происходит. Альтернативно вариант имеет консервативную замену до 20 аминокислот (например, консервативную замену до 15, до 10 или до 5 аминокислот; например, консервативную замену 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:55, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, а легкая цепь содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:56, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:57, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, а легкая цепь содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:58, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62.

В конкретном варианте осуществления гуманизированное антитело включает тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:59, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, а легкая цепь содержит VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:60, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62.

Антитело против нектин-4 или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно получить и произвести с использованием способов, известных в данной области техники. Такие способы могут включать, например, получение и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из библиотеки фагового дисплея, библиотеки дрожжевого дисплея, иммортализованной В-клетки (например, мышинной В-клеточной гибридомной клетки или EBV-иммортализованной В-клетки). Также могут быть использованы способы иммунизации животных, например, иммунизация животного (например, мыши) антигеном или ДНК, кодирующей антиген, и из иммунизированных животных может быть выделена В-клетка, экспрессирующая антитело. Предпочтительно, В-клетка, экспрессирующая антитело, является иммортализованной, например, полученной в виде гибридомы или В-клетки,

иммортилизованной EBV. Клетка-хозяин также может быть трансформирована молекулой нуклеиновой кислоты или экспрессионным вектором, кодирующим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, и затем анти-нектин-4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению экспрессируются из клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления антитело против нектин-4 по настоящему изобретению получают от иммунизированного животного, например, от мыши, иммунизированной человеческим белком нектином-4.

Полиспецифическое антитело

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает полиспецифическое антитело, которое включает антитело против нектин-4 или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению и по меньшей мере одно другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или аналог антитела, так что полиспецифическое антитело способно связываться с нектином-4, а также по меньшей мере с одним другим антигеном.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело, триспецифическое антитело или тетраспецифическое антитело. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первый scFv (или scdsFv) и второй scFv (или scdsFv), где первый scFv (или scdsFv) содержит VH по настоящему изобретению и VL другого антитела, которые связаны коротким пептидным линкером, второй scFv (или scdsFv) содержит VL по настоящему изобретению и VH другого антитела, которые связаны более коротким пептидным линкером, другое антитело связывается с антигеном, отличным от нектин-4, и короткие пептидные линкеры содержат 5-10 аминокислотных остатков.

В одном варианте осуществления другой антиген представляет собой белок клеточной поверхности, рецептор или субъединицу рецептора. Белок клеточной поверхности может быть, например, рецептором иммунной клетки. Иммунная клетка может быть, например, иммунной эффекторной клеткой, такой как натуральная киллерная (NK) клетка, натуральная киллерная Т-клетка (NKT), цитотоксическая Т-клетка (CTL). В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело может связываться как с нектином-4, так и с PD-1.

Полиспецифическое антитело представляет собой, например, поливалентное антитело, которое может быть двухвалентным, трехвалентным, четырехвалентным или более.

В предпочтительном варианте осуществления полиспецифическое антитело содержит антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из scFv, dsFv, scdsFv, Fab, scFab, Fab', F(ab')₂.

Полиспецифическое антитело может также содержать константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи антитела. Константная область тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность, выбранную по

меньшей мере из части шарнирной области, CH1, CH2, CH3 или их комбинации. Предпочтительно константная область тяжелой цепи имеет CH1.

Способы конструирования полиспецифических антител с использованием представляющих интерес антител или фрагментов антител хорошо известны специалистам в данной области техники (см., например, опубликованную международную патентную заявку № WO 93/08829; Suresh et al., (1986) *Methods in Enzymology*, 121:210; Traunecker et al., (1991) *EMBO*, 10:3655-3659).

Полиспецифическое антитело может быть получено и выделено с использованием различных способов, известных в данной области техники. Например, методы рекомбинантных ДНК могут быть использованы для получения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полиспецифическое антитело, при необходимости молекулу нуклеиновой кислоты клонируют в векторе экспрессии, затем клетку-хозяин трансформируют молекулой нуклеиновой кислоты или вектором экспрессии, трансформированную клетку-хозяин культивируют в подходящих условиях, обеспечивающих экспрессию нуклеиновой кислоты или вектора экспрессии, и, наконец, полиспецифическое антитело выделяют и очищают из клетки-хозяина или ее культуральной среды.

Слитый белок

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку, который содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению и дополнительный биологически активный полипептид.

В предпочтительных вариантах осуществления дополнительный биологически активный полипептид представляет собой полипептид или белок, обладающий терапевтической активностью, связывающей активностью или ферментативной активностью. Неограничивающие примеры биологически активного полипептида могут включать, без ограничения указанными, белковый токсин (например, дифтерийный токсин, рицин), фермент (например, уреазу, пероксидазу хрена), цитокин.

Нуклеиновая кислота, вектор и клетка-хозяин

В другом аспекте настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую антитело против нектин-4 или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. Нуклеиновую кислоту можно получить с использованием способов, известных в данной области техники, например, путем выделения из библиотеки фагового дисплея, библиотеки дрожжевого дисплея, иммунизированного животного, иммортализованной клетки (например, мышинной В-клеточной гибридомной клетки, EBV-иммортализованной В-клетки) или путем химического синтеза. Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может быть кодон-оптимизированной для клетки-хозяина, используемой для экспрессии. Молекулу нуклеиновой кислоты можно выделить.

В еще одном аспекте настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты. В одном варианте осуществления

молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению получают в виде рекомбинантной нуклеиновой кислоты. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению клонирована в векторе экспрессии. Вектор экспрессии может дополнительно содержать дополнительную полинуклеотидную последовательность, такую как регуляторная последовательность и ген устойчивости к антибиотикам. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, может быть получена с использованием методов, хорошо известных в данной области техники, таких как химический синтез, методы рекомбинантных ДНК (например, методы полимеразной цепной реакции (ПЦР)) и т.д. (см. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Вектор экспрессии может также содержать полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид или белок, при этом полипептид или белок может способствовать детекции и/или выделению экспрессированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Такой полипептид или белок может включать, без ограничения указанными, аффинную метку (например, биотиновую, полигистидиновую метку (His6) или метку глутатион-S-трансферазы (GSH)), полипептид, содержащий сайт расщепления протеазой, и репортерный белок (например, флуоресцентный белок). Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может находиться в одном или нескольких векторах. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии представляет собой ДНК-плазмиду, например, ДНК-плазмиду для экспрессии в клетках бактерий, дрожжей или млекопитающих. В других вариантах осуществления вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор. В других вариантах осуществления вектор экспрессии представляет собой фаговый вектор или фагемидный вектор.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, которая содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту или вектор, как описано выше. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения клетку-хозяин используют для экспрессии антитела против нектин-4 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. Примеры клетки-хозяина включают, без ограничения указанными, прокариотические клетки (например, бактерии, например, *E. coli*), эукариотические клетки (например, дрожжи, клетки насекомых, клетки млекопитающих).

Бактерии (например, *E. coli* BL21(DE3)) особенно выгодны для экспрессии меньших антигенсвязывающих фрагментов, таких как фрагменты Fv, scFv, Fab и Fab'. В некоторых вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, клонируют в одном векторе и вводят в BL21(DE3). Клетки-хозяева млекопитающих, подходящие для экспрессии антител, включают, без ограничения указанными, клетки миеломы, клетки HeLa, клетки НЕК (например, клетки НЕК 293), клетки яичника китайского хомяка (CHO) и другие клетки млекопитающих, подходящие для экспрессии антител.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела против нектин-4 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению в клетке-хозяине, где способ включает следующие стадии:

(I) трансформацию клетки-хозяина по меньшей мере одной нуклеиновой кислотой или вектором экспрессии, описанным в настоящей заявке;

(II) культивирование трансформированной клетки-хозяина в подходящих условиях для обеспечения экспрессии нуклеиновой кислоты или вектора экспрессии; и

(III) выделение и очистку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению из клеток-хозяев или их культуральной среды.

В некоторых вариантах осуществления используют один вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь и легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления используют два вектора, где один кодирует легкую цепь антитела, а другой кодирует тяжелую цепь антитела. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин дополнительно содержит плазмиду-партнер, которая позволяет улучшить растворимость, стабильность и/или фолдинг антитела или фрагмента антитела. Методы выделения и очистки антитела из клеток-хозяев хорошо известны специалистам в данной области техники.

Конъюгат антитела

Настоящее изобретение также обеспечивает конъюгат антитела, который содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, конъюгированные по меньшей мере с одним терапевтическим агентом. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) представляет собой типичный тип конъюгата антитела, в котором терапевтический агент может представлять собой, например, цитотоксический агент.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления конъюгат антитела по настоящему изобретению способен нацеливаться на нектин-4-положительную клетку-мишень и отслеживать или уничтожать клетку-мишень. В некоторых более предпочтительных вариантах осуществления конъюгат антитела по настоящему изобретению избирательно лизует нектин-4-положительные раковые клетки. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка выбрана из клеток рака желудка, клеток рака молочной железы, клеток рака мочевого пузыря, клеток рака легких, клеток рака печени, клеток рака толстой кишки, клеток рака прямой кишки, клеток рака головы и шеи и клеток рака яичников.

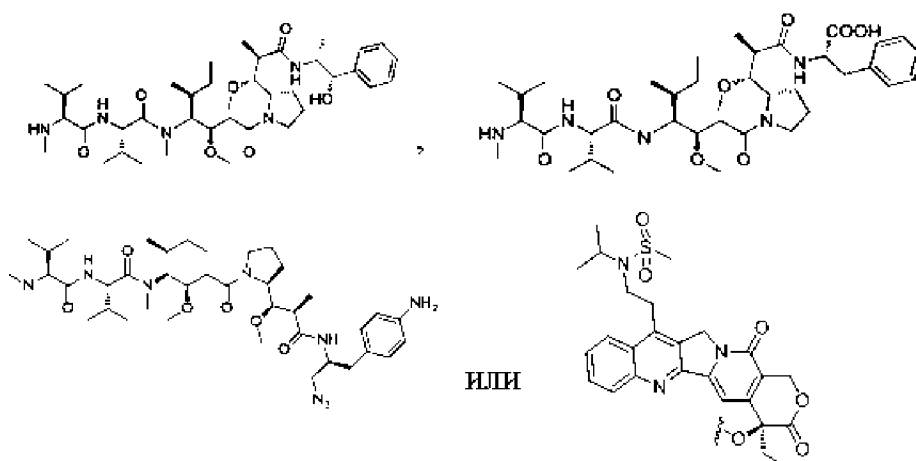
Терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из цитотоксического агента, терапевтического антитела (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с дополнительным антигеном), радиоизотопа, олигонуклеотида и его аналога (например, интерферирующей РНК), биологически активного пептида, белкового токсина (например, дифтерийного токсина, рицина) и фермента (например, уреазы). Цитотоксический агент относится к веществу, которое ингибирует или снижает активность или функцию клетки, и/или

убивает клетку. Примеры цитотоксических агентов могут включать, без ограничения указанными, майтанзиноиды (например, майтанзин), ауристатины (например, MMAF, MMAE, MMAD), дуостатин, криптофицин, алкалоиды барвинка (например, винбластин, винкристин), колхицины, доластатины, таксаны, паклитаксел, доцетаксел, кабазитаксел, ендиинового антибиотики, цитохалазины, камптотецины, антрациклины (например, даунорубицин, диgidроксиантрациндион, доксорубицин), цитотоксические антибиотики (например, митомицин, актиномицин, дуокармицин (например, CC-1065), аурамицин, дуомицин, калихеамицин, эндомицин, феномицин), доксорубицин, даунорубицин, калихеамицин, цисплатин, этидия бромид, блеомицин, митомицин, митрамицин, пладиенолид, подофиллотоксин, этопозид, митоксантрон, 5-фторурацил, цитарабин, гемцитабин, меркаптопурин, пентостатин, флударабин, кладрибин, неларабин, кармустин, ломустин, метотрексат, мелфалан, тенипозид, глюкокортикоид и др.

Радиоизотоп может быть выбран, например, из ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{131}I , ^{125}I , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{90}Y . Радиоизотопно меченное антитело может также называться радиоиммуноконъюгатом.

В одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой молекулу с противоопухолевой биологической активностью. Молекула с противоопухолевой биологической активностью включает, без ограничения указанными, цитотоксический агент, химиотерапевтический агент, радиоизотоп, ингибитор контрольной точки иммунного ответа, антитело, нацеленное на опухолеспецифический антиген, и другие противоопухолевые лекарственные средства. В предпочтительном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой цитотоксический агент. В еще одном предпочтительном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой радиоизотоп.

В конкретном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой

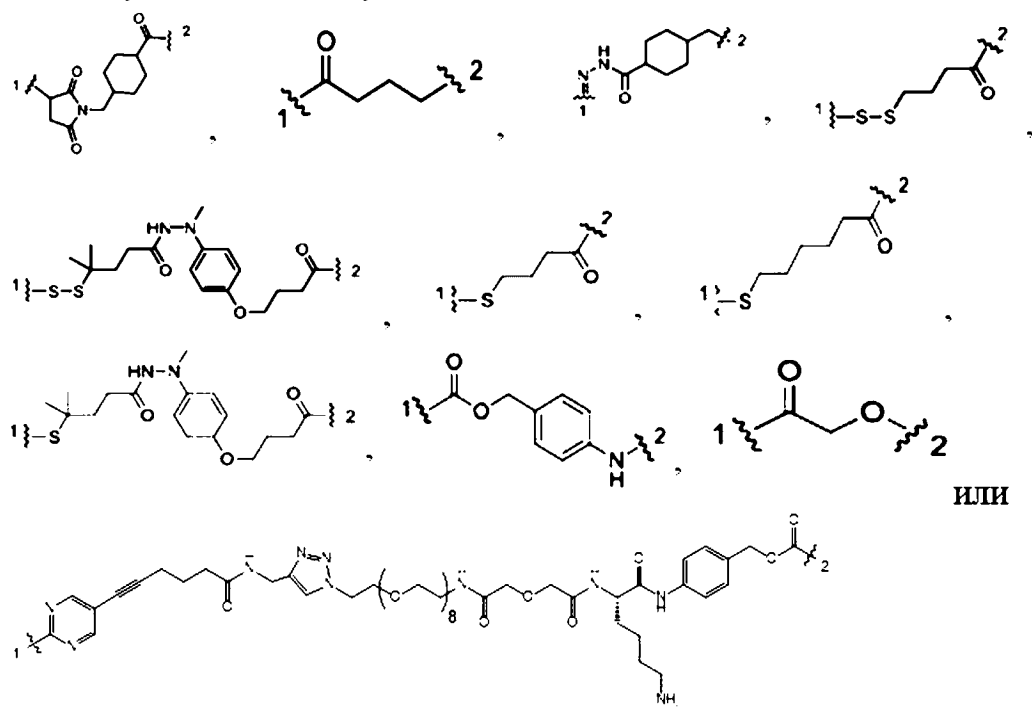


Терапевтический агент может быть конъюгирован с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению через линкер с использованием любого метода, известного в данной области техники. Линкер может содержать реакционноспособную группу для ковалентной конъюгации, такую как

аминовая, гидроксиламиновая, малеимидная, карбоксильная, фенильная, тиоловая, сульфгидрильная или гидроксильная группа. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Расщепляемый линкер представляет собой, например, ферментативно расщепляемый линкер (например, пептид, содержащий сайт расщепления протеазой), линкер, чувствительный к pH (например, линкер типа гидразона), или восстанавливаемый линкер (например, дисульфидную связь).

В одном варианте осуществления линкер содержит реакционноспособную группу, выбранную из группы, состоящей из аминовой, гидроксиламиновой, малеимидной, карбоксильной, фенильной, тиольной, сульфгидрильной и гидроксильной групп. В одном варианте осуществления линкер представляет собой химическую связь. В одном варианте осуществления линкер содержит аминокислоту или пептид, состоящий из 2-10 аминокислот. Аминокислота может быть натуральной или ненатуральной аминокислотой.

В предпочтительном варианте осуществления линкер выбран из группы, состоящей из Val, Cit, Phe, Lys, D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn,

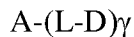


где одно из положений 1 и 2 представляет собой положение, в котором линкер присоединен к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по настоящему изобретению, а другое представляет собой положение, в котором линкер присоединен к терапевтическому агенту.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент и линкер конъюгируют с образованием промежуточного соединения перед конъюгацией антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления промежуточное соединение связано путем образования тиоэфирной связи с сульфгидрильной группой антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. Структура и способ получения такого промежуточного соединения, а также способ его использования для получения конъюгата

антитела описаны, например, в опубликованной международной патентной заявке № WO 2019/114666, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей полноте.

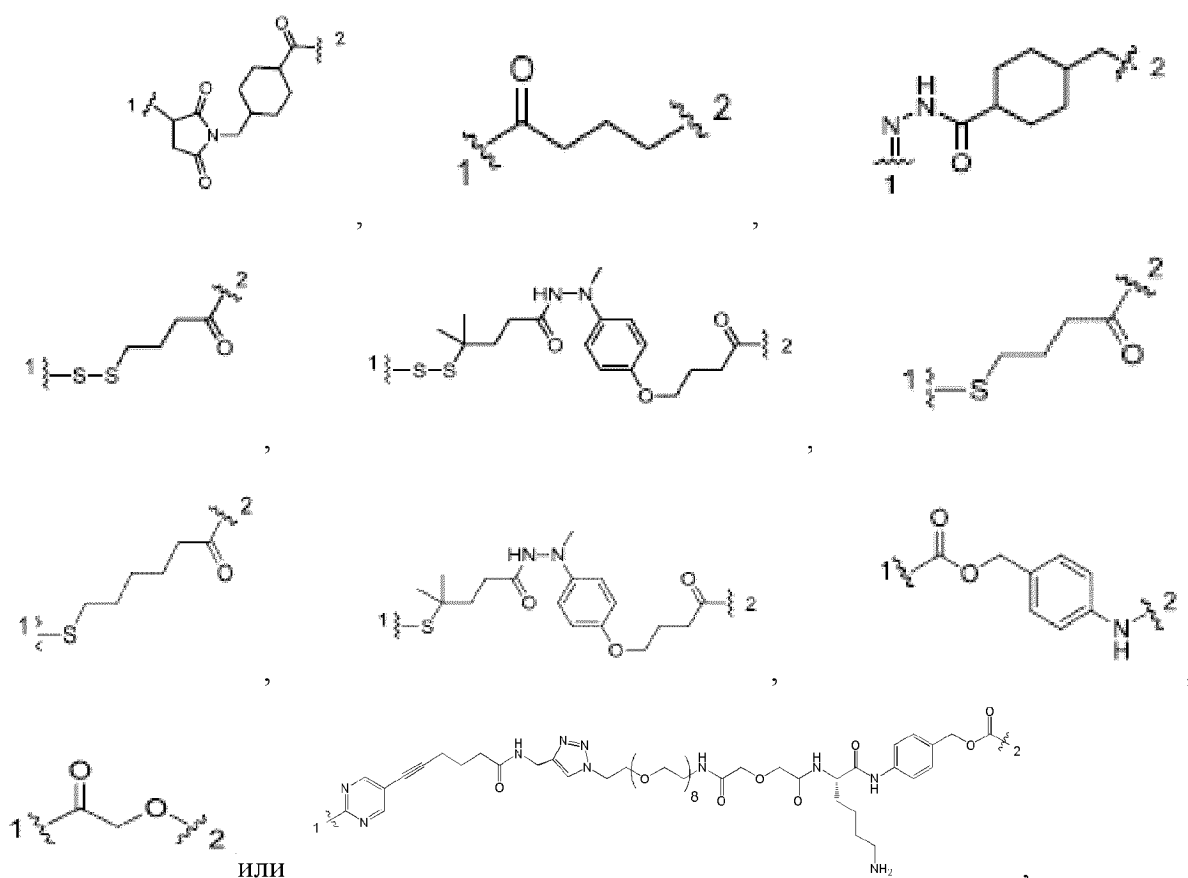
В одном варианте осуществления конъюгат антитела имеет структуру, представленную Формулой (I),



(I);

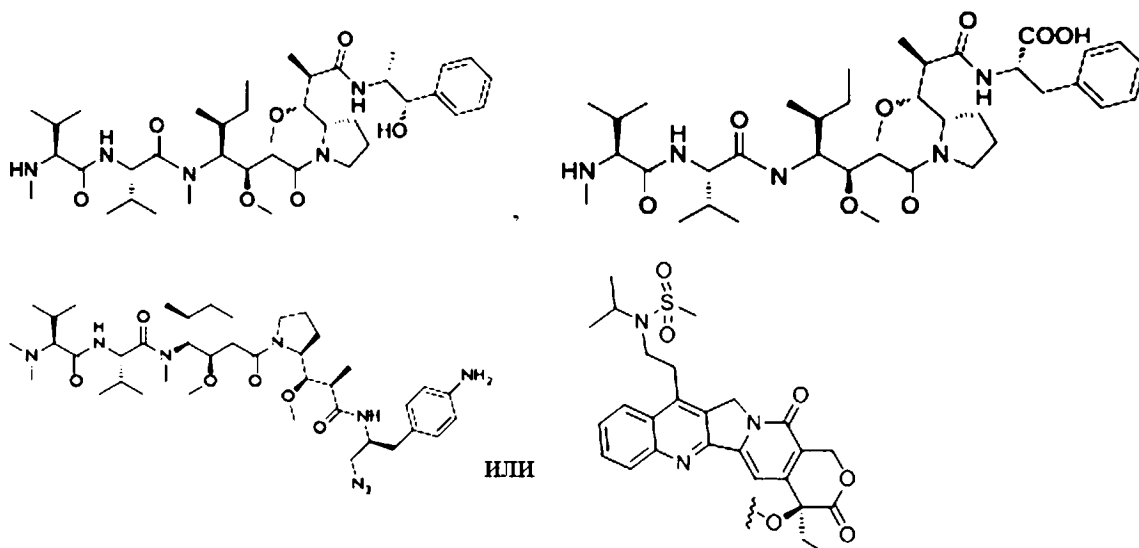
где А представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению;

L представляет собой линкер; предпочтительно L включает аминокислоту или пептид, состоящий из 2-10 аминокислот; более предпочтительно L выбран из Val, Cit, Phe, Lys, D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn,



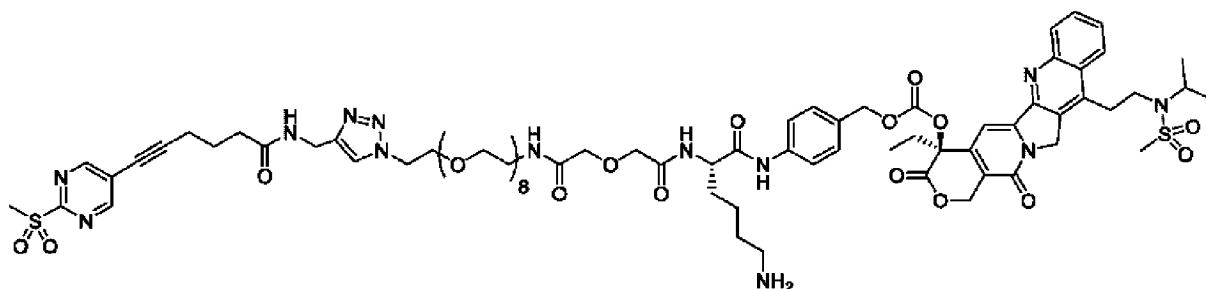
при этом одно из положений 1 и 2 представляет положение, в котором соединены L и A, а другое представляет собой положение, в котором соединены L и D;

D представляет собой терапевтический агент; предпочтительно D выбран из группы, состоящей из цитотоксических агентов, терапевтических антител, радиоизотопов, олигонуклеотидов и их аналогов, биологически активных пептидов, белковых токсинов и ферментов, более предпочтительно, D представляет собой противоопухолевый биологически активный агент, более предпочтительно, D представляет собой



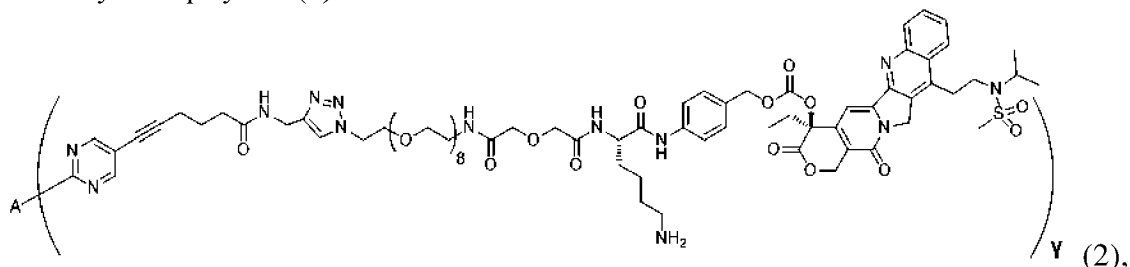
γ представляет собой количество фрагментов (L-D), связанных с А, которое представляет собой целое число от 1 до 10.

В конкретном варианте осуществления фрагмент (L-D) имеет структуру, представленную Формулой (1), которая связана путем образования тиозфирной связи между сульфгидрильной группой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению и соединением Формулы (1),



Формула (1),

причем конъюгат антитела по настоящему изобретению имеет структуру, представленную Формулой (2):



где А представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, а γ представляет собой количество фрагментов (L-D), связанных с А посредством образования тиозфирной связи с сульфгидрильной группой А, которое представляет собой целое число от 1 до 10. В конкретном варианте осуществления А представляет собой гуманизированное моноклональное антитело против нектин-4 человека по настоящему изобретению.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, которая содержит конъюгат антитела по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления молярное отношение (значение DAR) терапевтического агента к антителу против нектин-4 или его антигенсвязывающему фрагменту по настоящему изобретению в композиции представляет собой десятичное или целое число от 1 до 10, например, десятичную дробь или целое число от 1 до 8, например, 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,1; 3,2; 3,3; 3,4; 3,5; 3,6; 3,7; 3,79; 3,8; 3,9; 4,0; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 5,0; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 6,95; 7,0; 7,03; 7,1; 7,12; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9 или 8,0.

CAR и CAR-экспрессирующие иммунные эффекторныe клетки

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно использовать для конструирования химерного антигенного рецептора (CAR). Следовательно, в другом аспекте настоящее изобретение также относится к химерному антигенному рецептору (CAR).

Используемый в настоящей заявке термин «химерный антигенный рецептор (CAR)» представляет собой искусственный рецептор, который специфически распознает и связывается с мишенью (например, антигеном, экспрессированным на поверхности раковой клетки), например, с помощью антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающегося с антигеном на поверхности раковой клетки, и может обеспечивать специфичность к распознаванию мишени для клетки (например, иммунной эффекторной клетки), которая экспрессирует CAR на своей поверхности. Предпочтительно распознавание мишени с помощью CAR приводит к активации и/или экспансии CAR-экспрессирующей иммунной эффекторной клетки.

В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) по настоящему изобретению, которые специфически связываются с нектином-4, трансмембранным доменом и одним или несколькими внутриклеточными сигнальными доменами Т-клеток. В таких вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор, причем нуклеотидная последовательность химерного антигенного рецептора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, ScFv) по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует химерный антигенный рецептор, содержащий антигенсвязывающий фрагмент (например, ScFv) антитела по настоящему изобретению. Молекула нуклеиновой кислоты может быть изолированной.

В еще одном аспекте настоящее изобретение также обеспечивает иммунную эффекторную клетку, которая генетически модифицирована для экспрессии CAR по настоящему изобретению на поверхности. Предпочтительно иммунная эффекторная

клетка выбрана из группы, состоящей из Т-лимфоцитов (например, цитотоксических Т-клеток (CTL)), натуральных киллерных клеток (NK) и натуральных киллерных Т-клеток (NKT). Иммунная эффекторная клетка нацелена на нектин-4-положительную больную клетку (например, нектин-4-положительную раковую клетку) и активируется для инициации эффекторной функции, например, индукции гибели нектин-4-положительной раковой клетки.

В еще одном аспекте настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, вектору экспрессии, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, и иммунной клетке (например, CTL), экспрессирующей CAR.

Фармацевтическая композиция

Настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтическую композицию, которая содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела, CAR-экспрессирующую иммунную эффекторную клетку, полиспецифическое антитело или слитый белок по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель и эксципиент.

Предлагаемая в настоящей заявке фармацевтическая композиция может быть в различных лекарственных формах, включая, без ограничения указанными, твердую, полутвердую, жидкую, порошкообразную или лиофилизированную форму.

В зависимости от лекарственной формы фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент могут включать, без ограничения указанными, разбавители, связующие вещества и адгезивные агенты, смазки, дезинтегранты, консерванты, носители, диспергаторы, агенты, способствующие текучести, подсластители, покрытия, структурообразующие эксципиенты, консерванты, антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, цистеина гидрохлорид, натрия бисульфат, натрия метабисульфит, натрия сульфит, аскорбилпальмитат, бутилгидроксианизол (БНА), бутилгидрокситолуол (БНТ), лецитин, пропилгаллат, α -токоферол, лимонную кислоту, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), сорбитол, винную кислоту, фосфорную кислоту и т.д.), солюбилизаторы, желирующие агенты, смягчители, растворители (например, воду, спирт, уксусную кислоту и сироп), буферы (например, фосфатный буфер, гистидиновый буфер и ацетатный буфер), поверхностно-активные вещества (например, неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 80, полисорбат 20, полуксамер или полиэтиленгликоль), антибактериальные агенты, противогрибковые агенты, изотонические агенты (например, трегалозу, сахарозу, маннитол, сорбитол, лактозу, глюкозу), агенты, замедляющие абсорбцию, хелатирующие агенты и эмульгаторы.

Предпочтительно фармацевтическая композиция пригодна для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). Для композиций, содержащих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитела, предпочтительными лекарственными формами обычно могут быть, например, растворы

для инъекций, лиофилизированные порошки. Для композиций, содержащих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитела, подходящий носитель и/или эксципиент можно выбрать из буферов (например, цитратного буфера, ацетатного буфера, фосфатного буфера, гистидинового буфера, гистидин-солевого буфера), изотонических агентов (например, трегалозы, сахарозы, маннитола, сорбитола, лактозы, глюкозы), неионогенных поверхностно-активных веществ (например, полисорбата 80, полисорбата 20, поллоксамера) или их комбинаций.

Фармацевтическая композиция обычно является стерильной и стабильной в условиях изготовления и хранения. Путем смешивания активных веществ (например, антитела или конъюгата антитела по настоящему изобретению) в необходимом количестве в подходящем растворителе и добавления при необходимости одного или комбинации перечисленных выше носителей и/или эксципиентов с последующей стерилизующей микрофильтрацией можно приготовить стерильный раствор для инъекций. Как правило, дисперсию готовят путем включения активного вещества в стерильный носитель и/или эксципиент, содержащий основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты, перечисленные выше. В случае стерильного порошка для приготовления стерильного раствора для инъекций предпочтительный способ приготовления включает вакуумную сушку и лиофилизацию соответствующего предварительно стерильно отфильтрованного раствора с получением порошка активного ингредиента в сочетании с любыми необходимыми дополнительными ингредиентами.

Предлагаемая в настоящей заявке фармацевтическая композиция может быть введена субъекту любым способом, известным в данной области техники, например, системным или местным введением. Пути введения включают, без ограничения указанными, парентеральный (например, внутривенный, интраперитонеальный, внутрикожный, внутримышечный, подкожный или внутримышечный), местный, эпидуральный или через слизистую оболочку (например, интраназальный, пероральный, вагинальный, ректальный, сублингвальный или местный). Специалистам в данной области техники будет понятно, что точная вводимая доза будет зависеть от различных факторов, таких как метаболические свойства фармацевтической композиции, продолжительность лечения, скорость выведения конкретного соединения, цель лечения, способ введения и характеристики субъекта, такие как возраст пациента, состояние здоровья, масса тела, пол, рацион, история болезни и другие факторы, хорошо известные в области медицины. Способ введения может быть, например, инъекцией или инфузией.

В качестве общего руководства конъюгат антитела по настоящему изобретению можно вводить в диапазоне доз примерно от 0,0001 до 100 мг/кг, более предпочтительно от 0,01 до 20 мг/кг массы тела субъекта. Например, доза введения может составлять 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела, 10 мг/кг массы тела или 20 мг/кг массы тела, или в диапазоне от 1 до 20 мг/кг массы тела. Примерные требуемые схемы лечения могут быть введением один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в месяц, один раз

в 3 месяца, один раз в 3-6 месяцев или в течение слегка укороченного начального интервала дозирования и удлиненного более позднего интервала дозирования. Способ введения может быть внутривенным капельным.

Заболевание, связанное с нектином-4

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела, иммунную эффекторную клетку, полиспецифическое антитело, слитый белок или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, или лекарственное средство, полученное на их основе, можно использовать для лечения и/или профилактики заболевания. Заболевание является ассоциированным с нектином-4. Предпочтительно заболевание ассоциировано с аномальной экспрессией нектина-4. Термин «аномальная экспрессия» относится к слишком высокой или слишком низкой экспрессии белка в образце по сравнению с образцом в нормальном состоянии (или стандартным образцом, например, образцом от субъекта, не страдающего заболеванием, связанным с аномальной экспрессией нектина-4).

Предпочтительно заболевание характеризуется высокой экспрессией нектина-4. Например, нектин-4 на высоком уровне экспрессируется в ткани (например, в мочевом пузыре) субъекта с заболеванием или подозрением на него (например, раком мочевого пузыря), в то время как нектин-4 не экспрессируется или находится на низком уровне в ткани субъекта, не имеющего заболевания.

Предпочтительно заболевание представляет собой рак. Предпочтительно рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака мочевого пузыря, уротелиального рака, рака уретры, рака почечной лоханки, рака мочеточника, рака легких, немелкоклеточного рака легких, рака молочной железы, рака протоков молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака головы и шеи, рака толстой кишки, рака прямой кишки и рака пищевода.

Терапия рака может быть оценена, например, по степени регрессии опухоли, по изменению массы или размера опухоли, времени прогрессирования, времени выживания, выживаемости без прогрессирования, общей частоте ответа, продолжительности ответа, качеству жизни, экспрессии и/или активности белка и т.д., но не ограничиваясь этим.

Использование для диагностики и лечения

Антитело против нектина-4, или его антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитела по настоящему изобретению можно использовать в диагностических целях для обнаружения, диагностики или мониторинга заболевания и/или нарушения, связанного с нектином-4. Например, антитело против нектина-4 или его антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитела, предложенные в настоящей заявке, можно использовать *in situ*, *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro* в диагностическом анализе или анализе визуализации.

В некоторых вариантах осуществления для определения уровня экспрессии нектина-4 у субъекта и/или для отслеживания клеток, экспрессирующих нектин-4, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно

конъюгировать по меньшей мере с одной меткой для получения меченого антитела. Такое меченое антитело также входит в объем понятия «антитело или его антигенсвязывающий фрагмент» по настоящему изобретению. Метку предпочтительно выбирают из группы, состоящей из фермента (например, пероксидазы хрена), флуоресцентного красителя, радиоизотопа, биотина и коллоидного золота. Методы конъюгации метки с антителом хорошо известны специалистам в данной области техники.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ детекции присутствия или определения уровня экспрессии нектин-4 в образце, включающий:

(a) обеспечение контактирования образца с антителом или антигенсвязывающим фрагментом или меченым антителом по настоящему изобретению;

(b) выявление образования или определение количества иммунного комплекса антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и нектин-4 в образце, чтобы обнаружить присутствие или определить экспрессию нектин-4 в образце.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ диагностики заболевания, связанного с нектином-4, у субъекта, включающий:

(a) получение образца субъекта;

(b) использование антитела или антигенсвязывающего фрагмента или меченого антитела по настоящему изобретению для определения уровня экспрессии нектин-4 в образце;

(c) сравнение уровня экспрессии нектин-4 с уровнем экспрессии эталонного белка, где повышение или снижение уровня экспрессии нектин-4 по сравнению с уровнем экспрессии эталонного белка указывает на аномальную экспрессию нектин-4.

Эталонным белком может быть нектин-4 в стандартном образце, а стандартный образец может быть, например, образцом от субъекта, не страдающего заболеванием, связанным с аномальной экспрессией нектин-4. Образец может быть в любой форме, такой как клетка, ткань, жидкость организма. Вышеуказанная детекция может быть выполнена с использованием методов, известных в данной области техники, включая вестерн-блоттинг, проточную цитометрию, иммуногистохимический анализ (ИГХА), ELISA анализ, но без ограничения указанными.

Настоящее изобретение также относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела, иммунной эффекторной клетки, полиспецифического антитела, слитого белка или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для лечения и/или профилактики заболевания.

Настоящее изобретение также относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела, иммунной эффекторной клетки, полиспецифического антитела, слитого белка или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в производстве лекарственного средства, где лекарственное средство используют для лечения и/или профилактики заболевания. В одном варианте осуществления заболевание представляет собой рак, как описано в настоящей заявке.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела, иммунную эффекторную клетку, полиспецифическое антитело, слитый белок или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить в комбинации по меньшей мере с одним или несколькими терапевтическими агентами, описанными в настоящей заявке. Способ комбинированного введения не ограничен. Например, указанные выше терапевтические агенты можно вводить все одновременно или по отдельности. При раздельном введении (в случае отличающихся схем введения) их можно вводить непрерывно без перерыва или с заранее установленным интервалом.

Способ лечения

Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболевания, связанного с нектин-4, у субъекта, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления заболевание представляет собой рак, как описано в настоящей заявке.

Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела, композиции, иммунной эффекторной клетки, полиспецифического антитела, слитого белка или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению дополнительно включает применение схемы лечения, выбранной из группы, состоящей из хирургии, лучевой терапии, химиотерапии, таргетной терапии, иммунотерапии, гормональной терапии, ингибирования ангиогенеза и паллиативной терапии.

В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению дополнительно включает введение одного или нескольких терапевтических средств, выбранных из группы, состоящей из химиотерапевтических средств, радиоизотопов, ингибиторов иммунной контрольной точки, антител, нацеленных на другие антигены, и других противоопухолевых препаратов. Химиотерапевтические агенты могут включать, например, антиметаболиты, алкилирующие агенты, цитотоксические агенты, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы микротрубочек. Другие противоопухолевые препараты могут включать, например, ингибиторы ангиогенеза, ингибиторы деацетилазы (HDAC), блокаторы сигнального пути Hedgehog, ингибиторы mTOR, ингибиторы p53/mdm2, ингибиторы PARP, ингибиторы протеасом (например, бортезомиб, карфилзомиб, иксазомиб, маризомиб, опророзомиб) и ингибиторы тирозинкиназы (например, ингибитор ВТК). Примеры химиотерапевтических агентов включают, без ограничения указанными, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан, бусульфан, хлорметин, хлорамбуцил, ломустин, кармустин (BCNU), CCNU, цисплатин (DDP), карбоплатин (CBP), оксалиплатин (OXA), метотрексат (MTX), 6-меркаптопурин (6-MP), 5-фторурацил (5-FU), цитарабин, гемцитабин, винбластин, винкристин, виндезин, камптотецин, иринотекан, топотекан, рубитекан, этопозид, тенипозид, паклитаксел, таксан, доцетаксел, липосомы паклитаксела, актиномицин D, идарубицин, доксорубицин, эпирубицин, митомицин, блеомицин, доксорубицин, эпирубицин. Ингибиторы иммунной контрольной точки включают, без ограничения указанными, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые

специфически связываются с PD-1, PD-L1, CTLA4, LAG-3, TIM-3 или VISTA. Радиоизотопы могут включать, например, ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{131}I , ^{125}I , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{90}Y .

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела, иммунную эффекторную клетку, полиспецифическое антитело, слитый белок или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с химиотерапевтическим агентом. В одном варианте осуществления химиотерапевтический агент выбран из группы, состоящей из цисплатина, оксалиплатина, гемцитабина, циклофосфида, 5-фторурацила и их комбинаций. В других вариантах осуществления конъюгат антитела по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором контрольной точки иммунного ответа. В одном варианте осуществления ингибитор иммунной контрольной точки выбран из группы, состоящей из антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего фрагмента, антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, и их комбинации. В других вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела, иммунную эффекторную клетку, полиспецифическое антитело, слитый белок или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с радиоизотопом.

Набор

Настоящее изобретение также относится к набору, который содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела, меченое антитело, полиспецифическое антитело, слитый белок, фармацевтическую композицию или иммунную эффекторную клетку по настоящему изобретению и инструкцию по применению. Набор может также включать подходящий контейнер. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит устройство для введения. Как правило, набор также содержит этикетку, которая применяется для описания предполагаемого использования и/или способа применения содержимого набора. Термин «этикетка» включает любой письменный или задокументированный материал на наборе или вместе с ним, или иным образом поставляемый с набором.

Благоприятный эффект

В конкретном аспекте настоящее изобретение обеспечивает антитело против нектин-4 или его антигенсвязывающий фрагмент, в частности, гуманизированное моноклональное антитело против нектин-4. Антитело по настоящему изобретению обладает высокой аффинностью к нектину-4: в примерах для определения аффинности связывания антитела по настоящему изобретению с нектином-4 используют различные методы, такие как ELISA, технология биослойной интерференции и проточная цитометрия, и результаты показывают, что антитело против нектин-4 по настоящему изобретению обладает высокой аффинностью как к очищенному *in vitro* нектину-4, так и к нектину-4 клеточной поверхности. Неожиданно оказалось, что динамическая аффинность гуманизированных моноклональных антител 31HZ, 56HZ и 74HZ к нектину-4 человека и нектину-4 яванского макака лучше, чем у энфортумаба предшествующего уровня

техники, что указывает на то, что антитело по настоящему изобретению обладает более высокой аффинностью к нектину-4 при связывании *in vivo*; и это также подтверждается более высокой эндоцитозной активностью антител 31HZ, 56HZ и 74HZ. Кроме того, антитело по настоящему изобретению обладает высокой специфичностью в отношении нектин-4: все антитела 31HZ, 56HZ и 74HZ специфически распознают человеческий нектин-4, но не распознают нектин-1, нектин-2 и нектин-3. Кроме того, антитело по настоящему изобретению блокирует связывание нектин-4 с нектином-1, а конкурентная способность связывания 31HZ, 56HZ и 74HZ с нектином-4 сравнима со способностью энфортумаба.

В другом конкретном аспекте настоящее изобретение также обеспечивает конъюгат антитела против нектин-4, который может нацеливаться на нектин-4-положительную клетку. Конъюгат антитела по настоящему изобретению может нацеливаться на нектин-4-положительные клетки с высокой аффинностью и высокой специфичностью, что очень полезно для лечения рака или диагностики *in vivo*, поскольку высокая аффинность и специфичность могут снижать нецелевые токсические эффекты. и уменьшать побочные эффекты. Примеры также подтверждают это. ADC по настоящему изобретению обладает сильной литической активностью в отношении различных линий опухолевых клеток, таких как клетки рака протоков молочной железы человека, клетки рака желудка человека и клетки рака молочной железы человека, которые эндогенно экспрессируют нектин-4 человека. Кроме того, на модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легкого у мышей ADC по настоящему изобретению проявляет значительную опухоль-ингибирующую активность и демонстрирует хорошую безопасность.

Краткое описание чертежей

На Фигуре 1А показаны результаты проточной цитометрии стабильной клеточной линии A549-Nectin-4.

На Фигуре 1В показаны результаты проточной цитометрии стабильной клеточной линии T24-Nectin-4.

На Фигуре 2 показаны результаты определения аффинности мышинового антитела против человеческого нектин-4.

На Фигуре 3А показаны результаты детекции с помощью ELISA аффинности связывания между гуманизированным моноклональным антителом 31HZ против человеческого нектин-4 и человеческим белком нектином-4.

На Фигуре 3В показаны результаты детекции с помощью ELISA аффинности связывания между гуманизированным моноклональным антителом 74HZ против человеческого нектин-4 и человеческим белком нектином-4.

На Фигуре 3С показаны результаты детекции с помощью ELISA аффинности связывания между гуманизированным моноклональным антителом 56HZ против человеческого нектин-4 и человеческим белком нектином-4.

На Фигуре 3D показаны результаты детекции с помощью ELISA аффинности связывания между гуманизированным моноклональным антителом 31HZ против человеческого нектина-4 и белком нектином-4 яванского макака.

На Фигуре 3E показаны результаты детекции с помощью ELISA аффинности связывания между гуманизированным моноклональным антителом 74HZ против человеческого нектина-4 и белком нектином-4 яванского макака.

На Фигуре 3F показаны результаты детекции с помощью ELISA аффинности связывания между гуманизированным моноклональным антителом 56HZ против человеческого нектина-4 и белком нектином-4 яванского макака.

На Фигуре 4A показаны результаты проточной цитометрии для определения аффинности гуманизированных моноклональных антител против человеческого нектина-4 31HZ, 74HZ к клеткам T47D.

На Фигуре 4B показаны результаты проточной цитометрии для определения аффинности связывания между гуманизированным моноклональным антителом против человеческого нектина-4 56HZ и клетками NCI-N87.

На Фигуре 5A показаны результаты детекции активности эндоцитоза гуманизированных моноклональных антител против нектина-4 человека 31HZ и 74HZ на клетках T47D.

На Фигуре 5B показаны результаты определения активности эндоцитоза гуманизированных моноклональных антител против нектина-4 человека 31HZ и 74HZ на клетках MDA-MB-468.

На Фигуре 5C показаны результаты определения активности эндоцитоза гуманизированных моноклональных антител против человеческого нектина-4 31HZ и 74HZ на клетках A549-Nectin-4.

На Фигуре 5D показаны результаты определения активности эндоцитоза гуманизированного моноклонального антитела 56HZ против человеческого нектина-4 на клетках T24-Nectin-4.

На Фигуре 6A показаны результаты детекции гуманизированных моноклональных антител против нектина-4 человека 31HZ и 74HZ, распознающих домен нектина-4 человека.

На Фигуре 6B показаны результаты детекции гуманизированного моноклонального антитела 56HZ против нектина-4 человека, распознающего домен нектина-4 человека.

На Фигуре 7A показаны результаты детекции конкурентной активности гуманизированных моноклональных антител против нектина-4 человека 31HZ и 74HZ.

На Фигуре 7B показаны результаты детекции конкурентной активности гуманизированного моноклонального антитела 56HZ против человеческого нектина-4.

На Фигуре 8A показаны результаты определения специфичности гуманизированного моноклонального антитела 31HZ против человеческого нектина-4.

На Фигуре 8B показаны результаты определения специфичности гуманизированного моноклонального антитела 74HZ против человеческого нектина-4.

На Фигуре 8C показаны результаты определения специфичности гуманизированного моноклонального антитела 56HZ против человеческого нектина-4.

На Фигуре 9A показаны результаты для ADCs против человеческого нектина-4 31HZ-TL001 и 74HZ-TL001, убивающих клетки A549-Nectin-4.

На Фигуре 9B показаны результаты для ADCs против человеческого нектина-4 31HZ-TL001 и 74HZ-TL001, убивающих клетки A549.

На Фигуре 9C показаны результаты для ADCs против человеческого нектина-4 31HZ-TL001 и 56HZ-TL001, убивающих клетки T24-Nectin-4.

На Фигуре 9D показаны результаты для ADCs против человеческого нектина-4 31HZ-TL001 и 56HZ-TL001, убивающих клетки T24.

На Фигуре 10A показаны результаты для ADCs против человеческого нектина-4 31HZ-TL001 и 74HZ-TL001, убивающих клетки T47D.

На Фигуре 10B показаны результаты для ADCs против человеческого нектина-4 31HZ-TL001 и 74HZ-TL001, убивающих клетки MDA-MB-468.

На Фигуре 10C показаны результаты для ADCs против человеческого нектина-4 31HZ-TL001 и 56HZ-TL001, убивающих клетки NCI-N87.

На Фигуре 11 показаны изменения объема опухоли в каждой группе мышей с течением времени на модели подкожного ксенотрансплантата опухолевых клеток NCI-H322M у мышей NOD/SCID.

На Фигуре 12 показаны изменения массы тела в каждой группе мышей с течением времени на модели подкожного ксенотрансплантата опухолевых клеток NCI-H322M у мышей NOD/SCID.

На Фигуре 13 показаны изменения объема опухоли в каждой группе мышей с течением времени на модели подкожного трансплантата клеток рака желудка HuPrime® BL9200 PDX у мышей NOD/SCID.

На Фигуре 14 показаны изменения массы тела в каждой группе мышей с течением времени на модели подкожного трансплантата клеток рака желудка HuPrime® BL9200 PDX у мышей NOD/SCID.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения и поэтому не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение каким-либо образом. В следующих примерах экспериментальные методы без конкретных условий применяли в соответствии с обычными методами и условиями или в соответствии с инструкциями к продукту.

Пример 1: Получение гуманизированного моноклонального антитела против нектина-4 человека

1.1. Конструирование клеточной линии со сверхэкспрессией нектина-4 человека

Для проверки специфичности и функции антител к нектину-4 человека полная кодирующая последовательность человеческого нектина-4 (идентификатор Uniprot: Q96NY8-1) (синтезирована компанией Nanjing GenScript Biotechnology Co., Ltd.) была

клонирована в лентивирусном векторе pLVX-IRES-puro, а вирус получали с помощью лентивирусной системы упаковки, описанной в литературе (Mohammadi Z et al., Mol Biotechnol. 2015 Sep; 57(9): 793-800), и полученный вирус использовали для заражения клеток немелкоклеточного рака легкого A549 (ATCC) и клеток переходно-клеточной карциномы мочевого пузыря человека T24 (ATCC), соответственно, и с помощью пуромицинового скрининга и моноклональной селекции были получены моноклональные стабильные клеточные линии A549-Nectin-4 и T24-Nectin-4, сверхэкспрессирующие человеческий нектин-4.

1.2. Детекция клеточных линий со сверхэкспрессией нектина-4 человека

Стабильные клеточные линии A549-Nectin-4 и T24-Nectin-4 идентифицировали с помощью проточной цитометрии (проточный цитометр: Beckman, CytoFlex; детектирующее антитело Enfortumab с последовательностью, указанной в опубликованной международной патентной заявке №: WO2012/047724), и было подтверждено, что клетки надлежащим образом экспрессировали нектин-4 человека. Как показано на Фигурах 1A и 1B, результаты проточной цитометрии продемонстрировали, что и A549-Nectin-4, и T24-Nectin-4 имели высокие показатели положительных результатов (близкие к 100%), свидетельствуя о том, что и A549-Nectin-4, и T24-Nectin-4 представляют собой высоко гомогенные стабильные клеточные линии, которые можно было использовать для последующих экспериментов.

1.3. Получение мышинового моноклонального антитела против нектина-4 человека

Мышей дикого типа иммунизировали белковой иммунизацией с получением мышинового моноклонального антитела против нектина-4 человека. Эмульгированный в полном адьюванте Фрейнда (CFA) человеческий белок нектин-4 (Sino Biological, Cat: 19771-H08H), использовали для иммунизации 2 мышей Balb/c и 2 мышей C57 в возрасте 5-6 недель каждая. В частности, 50 мкг белка использовали для проведения первичной подкожной иммунизации, затем 25 мкг эмульгированного в неполном адьюванте Фрейнда (IFA) белка нектина-4 использовали для проведения интраперитонеальной бустерной иммунизации каждые 2 недели. После 3-кратной бустерной иммунизации эндогенно экспрессирующие нектин-4 опухолевые клетки T47D 5×10^6 клеток (разновидность раковых клеток протока молочной железы человека) использовали для окончательной интраперитонеальной бустерной иммунизации, а через 3-5 дней отбирали клетки селезенки для осуществления гибридного слияния. Клетки селезенки мыши гибридизировали с линией клеток миеломы мыши Sp2/0 (ATCC, кат. № CRL-1581) с помощью ПЭГ с использованием стандартных процедур гибридизации, затем использовали НАТ для проведения скрининга под давлением, а через 10-14 дней проводили скрининг ELISA, и было получено около 200 положительных клонов, которые связались с белком нектином-4. Путем дальнейшего скрининга с помощью проточной цитометрии были получены 3 положительных гибридных клон, которые могли распознавать опухолевые клетки T47D, для субклонирования, и, наконец, была проведена

субклональная сортировка методом лимитирующих разведений для получения моноклонов, и их номера были следующими: 31#, 56# и 74#, соответственно.

1.4. Детекция аффинности мышинового антитела против человеческого нектин-4

Аффинность молекул-кандидатов к нектину-4 человека определяли методом ELISA. Моноклоны гибридомы 31#, 56# и 74# культивировали без сыворотки для получения 3-10 мл надосадочной жидкости, а затем очищали с помощью протеина А (MabSelect SuRe, GE) для получения мышинных антител.

Аффинность мышинных моноклональных антител, выделенных и очищенных из надосадочной жидкости культур гибридных клеточных линий 31#, 56# и 74#, определяли с помощью ELISA. Человеческий нектин-4 (Sino Biological, Cat: 19771-H08H) разбавляли до 1 мкг/мл карбонатным (CBS) буфером, добавляли в 96-луночный планшет в объеме 100 мкл/лунку и помещали на 4°C на 16-20 часов. Буфер CBS из лунок 96-луночного планшета удаляли пипетированием, планшет однократно промывали буфером PBST (pH 7,4; PBS, содержащий 0,05% Tween 20), добавляли PBST в объеме 200 мкл/лунку, содержащий 2% сухого обезжиренного молока (блокирующий раствор), и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре для блокировки. Блокирующий раствор удаляли, а планшет трижды промывали буфером PBST. Тестируемое мышинное антитело против нектин-4 разводили смесью PBST/2% сухого обезжиренного молока до соответствующей концентрации, затем добавляли в планшет в объеме 100 мкл/лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 1,5 часов. Реакционную систему удаляли, планшет трижды промывали PBST и добавляли 50 мкл/лунку меченого HRP вторичного козьего антитела против мышинового IgG (приобретенного в лаборатории Джексона), разведенного PBST/1% сухого обезжиренного молока (коэффициент разбавления 1:5000) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После 3-кратного промывания планшета с помощью PBST добавляли по 100 мкл/лунку TMB и инкубировали при комнатной температуре в течение 5-10 мин для проявления окраски. Развитие окраски останавливали добавлением 50 мкл/лунку 0,2 М серной кислоты. Ридер микропланшетов использовали для определения оптической плотности (ОП) при двух длинах волн 450/620 нм.

Результаты детекции представлены на Фигуре 2 и в Таблице 3. Все 3 мышинных антитела против нектин-4 человека были способны связывать белок нектин-4 человека с высокой аффинностью, с EC_{50} в диапазоне от 30 до 70 пМ.

Таблица 3: Детекция аффинности антител к человеческому нектину-4

Номер клона	EC_{50} (пМоль)
31#	54,95
56#	36,33
74#	69,39

1.5. Амплификация вариабельной области мышинных моноклональных антител против нектин-4

Клетки гибридомы культивировали примерно до 8000-10000 клеток, затем клетки лизировали и синтезировали первую цепь кДНК с использованием набора для обратной транскрипции кДНК (Thermo Fisher Sci., номер по каталогу № 18080-200). Гены VH и VK амплифицировали с помощью ПЦР из кДНК с использованием праймеров, а продукты ПЦР очищали с помощью набора для очистки ДНК (Qiagen, № по каталогу 28104) и лигировали с вектором PUC57. Приблизительно 5 клонов отбирали для каждой реакции лигирования и секвенировали. Последовательности анализировали с помощью биоинформационного программного обеспечения Vector NTI 11.5 (Thermo Fisher Sci.) и Sequencer 5.4.6 (Genecodes). Последовательности варибельной области и последовательности CDRs мышиных антител против человеческого нектин-4 были получены с помощью IMGT и abYsis и представлены в Таблице 4 ниже.

Таблица 4: Аминокислотные последовательности варибельных областей и CDRs мышиных антител против человеческого нектин-4.

Номер клона	VH	VL	Система нумерации	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
31#	1	2	Chothia	3	4	5	6	7	8
			Abm	9	10	5	6	7	8
			Kabat	11	12	5	6	7	8
			IMGT	13	14	15	16	17	8
56#	19	20	Chothia	21	22	23	24	25	26
			Abm	27	28	23	24	25	26
			Kabat	29	30	23	24	25	26
			IMGT	31	32	33	34	35	26
74#	37	38	Chothia	39	40	41	42	43	8
			Abm	45	46	41	42	43	8
			Kabat	47	48	41	42	43	8
			IMGT	49	50	51	52	53	8

Примечание. Номера в столбцах VH, VL, CDR-H1, CDRH2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 представляют соответствующие им SEQ ID NOs, например, для антитела 31# его VH соответствует SEQ ID NO:1, а его VL соответствует SEQ ID NO:2.

1.6. Гуманизация мышиного антитела против человеческого нектин-4

Мышиные антитела 31#, 56# и 74# гуманизировали прививкой CDRs. Вкратце, гуманизация включала следующие этапы: аминокислотную последовательность мышиного моноклонального антитела сравнивали с аминокислотной последовательностью антитела зародышевой линии человека, чтобы найти последовательности с высокой гомологией и лучшими физико-химическими свойствами, чем у каркасных последовательностей зародышевой линии человека; аффинность HLA-DR была проанализирована и исследована и были выбраны каркасные последовательности зародышевой линии человека с низкой аффинностью; и затем шесть CDR мышиных антител трансплантировали в выбранные каркасные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно.

Кроме того, применяли технологию компьютерного моделирования и молекулярный докинг для анализа каркасных аминокислотных последовательностей

вариабельной области и окружающих ее областей, а также исследовали их пространственный трехмерный способ связывания. Путем расчета электростатической силы, силы Ван-дер-Ваальса, гидрофильности и гидрофобности, а также значения энтропии были проанализированы ключевые аминокислоты в аминокислотных последовательностях мышинового антитела, которые могут взаимодействовать с белком нектином-4 и поддерживать пространственный каркас, и эти мышинные аминокислоты сохранялись в антителах, подвергнутых трансплантации. То есть, была проведена серия обратных мутаций аминокислотных остатков в области FR гуманизированной матрицы, чтобы максимально сохранить антигенсвязывающую способность мышинового антитела в гуманизированном антителе.

В соответствии с описанным выше способом гуманизированные антитела конструировали на основе CDRs мышинных антител 31#, 56# и 74#, которые были обозначены 31HZ, 56HZ и 74HZ, соответственно, где константные области тяжелой цепи каждого антитела представляли собой константную область тяжелой цепи IgG1 человека (SEQ ID NO:61), а константные области легкой цепи каждого антитела представляли собой константную область легкой цепи человека (SEQ ID NO:62). Аминокислотные последовательности CDR легкой цепи сконструированных гуманизированных антител 31HZ, 56HZ и 74HZ были идентичны CDR легкой цепи 31#, 56# и 74#, соответственно. Аминокислотные последовательности CDRs тяжелой цепи сконструированных гуманизированных антител 31HZ, 56HZ и 74HZ представлены в Таблице 5.1.

Таблица 5.1: Аминокислотные последовательности CDRs тяжелой цепи гуманизированных антител против человеческого нектина-4.

Группа CDRH	Система нумерации	CDR-H1 (SEQ ID NO:)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-H3 (SEQ ID NO:)
56HZCDRH-a	Chothia	GYFNSITSDY (18)	SFSGR (22)	GNYDGFYD (23)
56HZCDRH-b	Abm	GYFNSITSDYDWH (36)	YISFSGRTY (28)	
56HZCDRH-c	Kabat	ITSDYDWH (44)	YISFSGRTYYNPS LKS (30)	
56HZ CDRH-d	IMGT	GYFNSITSDYD (54)	ISFSGRT (32)	ARGNYDGFYD (33)
31HZ CDRH-a	Chothia	GYTFTDY (3)	HPSDSE (4)	WDFRIYYAMD Y (5)
31HZ CDRH-b	Abm	GYTFTDYWMN (9)	MIHPSDSETR (10)	
31HZ CDRH-c	Kabat	DYWMN (11)	MIHPSDSETRLN QKFQG (63)	
31HZ CDRH-d	IMGT	GYTFTDYW (13)	IHPSDSET (14)	ARWDFRIYYA MDY (15)
74HZ CDRH-a	Chothia	GYTFINY (39)	HPSDSA (40)	WGNFYTVNAW YYFDY (41)
74HZ CDRH-b	Abm	GYTFINYWMN (45)	MIHPSDSATR (46)	
74HZ CDRH-c	Kabat	NYWMN (47)	MIHPSDSATRLN QSFQG(64)	
74HZ CDRH-d	IMGT	GYTFINYW (49)	IHPSDSAT (50)	ARWGNFYTVN AWYYFDY (51)

Далее, аминокислотные последовательности вариабельной и константной областей гуманизированных антител 31HZ, 56HZ и 74HZ представлены в Таблице 5.2.

Таблица 5.2: Аминокислотные последовательности вариабельных и константных областей гуманизированных антител против человеческого нектина-4.

Название антитела	Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:)	Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:)	Константная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:)	Константная область легкой цепи (SEQ ID NO:)
31HZ	55	56	61	62
56HZ	57	58		
74HZ	59	60		

1.7. Получение гуманизированных антител против человеческого нектина-4

Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей вышеуказанных гуманизированных антител против человеческого нектина-4 синтезировали путем оптимизации кодонов и лигировали в плазмиду ptt5 (доверено Nanjing GenScript Biotechnology Co., Ltd.). Плазмиды, соответствующие тяжелой и легкой цепям, одновременно трансфицировали в клетки CHO-E, а надосадочную жидкость очищали с помощью белка A (MabSelect SuRe, GE) с получением гуманизированных антител против нектина-4 человека.

Пример 2: Определение аффинности гуманизированных моноклональных антител против нектина-4 человека

2.1 Определение аффинности гуманизированных моноклональных антител против человеческого нектина-4 к белку нектину-4 разных видов

Аффинность гуманизированных моноклональных антител против человеческого нектина-4 к белку нектину-4 разных видов определяли с помощью ELISA. Конкретные этапы были следующими: антиген человеческого нектина-4 или антиген нектина-4 яванского макака разбавляли до 1 мкг/мл покрывающим раствором CBS (навеску 0,32 г Na_2CO_3 и 0,59 г NaHCO_3 растворяли в деионизированной воде и доводили до 200 мл), наносили на планшет для ELISA по 100 мкл на лунку и оставляли на ночь при 4°C. Жидкость в лунке сливали на следующий день, однократно промывали 300 мкл PBS. Добавляли 100 мкл PBS (содержащего 2% BSA, приобретенного у BOVOGEN, номер по каталогу № BSAS 1.0), блокировали на 2 часа при 37°C. Антитела 31HZ, 56HZ, 74HZ и энфортумаб разбавляли (начиная с 1500 нг/мл, 3-кратное разведение, 11 точек концентрации) PBS (содержащим 2% BSA), отбирали 100 мкл и добавляли в соответствующую лунку и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Промывали 3 раза 300 мкл PBST. Меченое HRP вторичное антитело козы к антителу человека (приобретенное у Jackson, 109-035-00) разбавляли 1:10000 PBS (содержащим 2% BSA), отбирали 100 мкл, добавляли в соответствующую лунку и инкубировали при 37°C в

течение 1 часа. Промывали 5 раз 300 мкл PBST. 100 мкл раствора для проявления окраски TMB (приобретенного у InnoReagents, TMB-S-004) добавляли в соответствующую лунку, проявление окраски проводили при комнатной температуре в течение 5-20 минут. Для остановки добавляли 50 мкл 2н H₂SO₄, показания оптической плотности при 450 нм (OD450) снимали на ридере микропланшетов (от MD, SpectraMax M2) и помещали в программное обеспечение Graphpad Prism для подбора кривой.

Результаты эксперимента представлены на Фиг.3А-3F и в Таблице 6. Они свидетельствуют о том, что аффинность 31HZ к белку нектину-4 человека и белку нектину-4 яванского макака была лучше, чем у энфортумаба, а аффинность 56HZ и 74HZ к белку нектину-4 человека и белку нектину-4 яванского макака была в основном сравнима с аффинностью энфортумаба.

Таблица 6: Определение аффинности гуманизированных моноклональных антител против человеческого нектин-4 к белку нектину-4 разных видов.

Название антитела	EC ₅₀ (нг/мл)	
	Белок нектин-4 человека	Белок нектин-4 яванского макака
31HZ	3,60	4,45
56HZ	9,48	9,85
74HZ	8,34	6,73
Энфортумаб	7,10±2,00 (n=3)	6,00±0,66 (n=3)

2.2 Определение динамической аффинности гуманизированных моноклональных антител против человеческого нектин-4 к белку нектину-4 разных видов

Динамическую аффинность гуманизированных моноклональных антител против нектин-4 человека определяли с использованием системы Octet Fortebio®. Основные этапы включали следующее. Во-первых, гуманизированное моноклональное антитело против нектин-4 человека (концентрация 5 мкг/мл) иммобилизовали на датчике ProA, затем подвергали реакции связывания с нектином-4 человека или яванского макака (градиентно разбавленным до 400 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ, 0 нМ), а иммобилизованный продукт на твердой фазе, полученный в результате полной реакции, подвергали реакции диссоциации в буфере PBST. После завершения эксперимента результаты анализировали с использованием программного обеспечения Data Analysis 11.0 в режиме 1:1 для выполнения глобальной подгонки, таким образом получая константу аффинности антитела к антигену.

Результаты эксперимента представлены в Таблице 7. Динамическая аффинность 31HZ, 56HZ и 74HZ к белку нектину-4 человека и белку нектину-4 яванской макаки была лучше, чем у энфортумаба.

Таблица 7: Определение динамической аффинности гуманизированного моноклонального антитела против человеческого нектин-4 к белку нектину-4 разных видов

Название антитела	K _D (×10 ⁻⁹ М)	
	Белок нектин-4 человека	Белок нектин-4 яванского макака
31HZ	22,50	14,50

56HZ	19,60	18,40
74HZ	12,10	9,540
Энфортумаб	28,30±2,90 (n=2)	33,60±3,50 (n=2)

2.3 Определение аффинности гуманизированного моноклонального антитела против человеческого нектина-4 к человеческому нектину-4 на поверхности мембраны опухолевых клеток

Клетки T47D использовали для определения аффинности 31HZ и 74HZ к человеческому нектину-4 на поверхности клеточной мембраны. Конкретные этапы были следующими. Клетки T47D получали расщеплением, ресуспендировали центрифугированием и дважды отмывали PBS. Клетки ресуспендировали в PBS (содержащем 1% BSA) и распределяли в 96-луночной планшете с коническими лунками в количестве 3×10^5 клеток/лунку с объемом 50 мкл на лунку. В каждую лунку добавляли 50 мкл тестируемого антитела, начиная с конечной концентрации 15 мкг/мл, 4-кратное градиентное разведение, в целом, 10 точек концентрации. IgG человека использовали в качестве отрицательного контроля. После тщательного перемешивания полученную смесь подвергали реакции в темноте при 4°C в течение 1 часа. 3 раза промывали PBS, добавляли FITC-меченые вторичные антитела против человеческого Fc (торговая марка: BioLegend, номер продукта: 409322), инкубировали при 4°C в течение 0,5 часов в темноте и затем 3 раза отмывали PBS; детекцию проводили с помощью проточного цитометра (марка проточного цитометра: Beckman, модель: Cytotflex).

Тот же самый метод использовали для определения аффинности 56HZ к человеческому нектину-4 на поверхности мембраны клеток NCI-N87 (разновидность клеток рака желудка человека, ATCC). Титрование антитела начинали с 3,33 мкг/мл, 3-кратное разведение, в целом, 10 точек концентрации.

Результаты эксперимента представлены на Фигурах 4А, 4В и в Таблице 8, показывающих, что аффинность 31HZ и 56HZ к нектину-4 на поверхности клеточной мембраны была сравнима с аффинностью энфортумаба.

Таблица 8: Определение аффинности гуманизированных моноклональных антител против человеческого нектина-4 к человеческому нектину-4 на поверхности мембраны опухолевых клеток.

Название антитела	EC ₅₀ (нг/мл)	
	T47D	NCI-N87
31HZ	12,29	/
56HZ	/	16,39
74HZ	22,28	/
Энфортумаб	10,11	22,07

Примечание: /: не обнаружено.

Пример 3: Определение эндоцитозной активности гуманизированных моноклональных антител против человеческого нектина-4.

Эндоцитозную активность гуманизированных моноклональных антител против человеческого нектина-4 определяли с помощью проточной цитометрии. Конкретные этапы были следующими. Клетки T47D, MDA-MB-468 (разновидность клеток рака молочной железы человека, ATCC) или A549-Nectin-4 получали расщеплением трипсином и подсчитывали, затем клетки ресуспендировали в PBS (содержащем 1% BSA) и плотность клеток доводили до 3×10^6 /мл. Тестируемые антитела 31HZ, 56HZ или 74HZ добавляли к 100 мкл ресуспендированных клеток в конечной концентрации 10 мкг/мл (изотип IgG человека использовали в качестве отрицательного контроля) и инкубировали на льду в течение 1 часа. После 3-кратного отмывания предварительно охлажденным PBS после инкубации клетки ресуспендировали в среде для культивирования клеток и делили на две части, одну часть помещали в клеточный инкубатор при 37°C и инкубировали в течение 1, 2 и 4 часов (группа эндоцитоза), а другую часть держали на льду и инкубировали в течение 1, 2 и 4 часов (группа аффинности). После инкубации клетки промывали 3 раза предварительно охлажденным PBS, ресуспендировали в 50 мкл PBS (содержащего 1% BSA), добавляли античеловеческие флуоресцентные вторичные антитела (BioLegend) и инкубировали при 4°C в течение получаса. После инкубации отмывали 3 раза предварительно охлажденным PBS, затем флуоресцентный сигнал (выраженный в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI)) на клетках регистрировали с помощью проточного цитометра (Beckman) и рассчитывали скорость эндоцитоза антител в соответствии со следующей формулой: коэффициент эндоцитоза (%) = $[1 - (\text{MFI группы антител при } 37^\circ\text{C} - \text{MFI контрольной группы при } 37^\circ\text{C}) / (\text{MFI группы антител на льду} - \text{MFI контрольной группы на льду})] \times 100\%$.

Таким же методом определяли эндоцитозную активность 56HZ на клетках T24-Nectin-4.

Результаты эксперимента представлены на Фигурах 5A-5D, показывающих, что эндоцитозная активность 31HZ, 56HZ и 74HZ была лучше, чем у энфортумаба.

Пример 4: Определение связывающего домена гуманизированных моноклональных антител против нектина-4 человека по отношению к нектину-4 человека

Нектин-4 человека содержит один домен IgV и два домена IgC. Для определения связывающего домена гуманизированных моноклональных антител против человеческого нектина-4 конструировали стабильную клеточную линию A549, A549-Nectin-4-IgV, сверхэкспрессирующую домен IgV нектина-4, и стабильную клеточную линию A549-Nectin-4-IgCC, сверхэкспрессирующую два домена IgC нектина-4, и связывающие домены тестируемого антитела выявляли с помощью проточной цитометрии. Конкретные стадии были следующими. Клетки A549-Nectin-4-IgV и A549-Nectin-4-IgCC получали расщеплением, ресуспендировали центрифугированием, дважды отмывали PBS. Клетки ресуспендировали в PBS (содержащем 1% BSA) и распределяли по 300 000 клеток/лунку в 96-луночный планшет с коническими лунками, 50 мкл на лунку. В каждую лунку

добавляли 50 мкл тестируемого антитела в конечной концентрации 40 мкг/мл, в качестве отрицательного контроля использовали IgG человека. После тщательного перемешивания полученную смесь подвергали реакции в темноте при 4°C в течение 1 часа, 3 раза отмывали PBS, добавляли FITC-меченые вторичные антитела против человеческого Fc (торговая марка: BioLegend, номер продукта: 409322), инкубировали при 4°C в течение 0,5 часов в темноте и 3 раза отмывали PBS; детекцию проводили с помощью проточного цитометра (марка проточного цитометра: Beckman, модель: Cytotflex).

Результаты эксперимента представлены на Фиг.6А и 6В, показывающих, что 31HZ, 56HZ, 74HZ и энфортумаб связываются только с доменом IgV человеческого нектина-4, а не с доменом IgC.

Пример 5: Определение конкурентной активности гуманизированных моноклональных антител против нектина-4 человека

Нектин-4 человека связан с другой молекулой нектина-4 или молекулой нектина-1 через домен IgV. Поскольку все 31HZ, 56HZ и 74HZ связываются с доменом IgV нектина-4, определяли конкурентную активность трех антител с помощью конкурентного ELISA. Конкретные этапы были следующими. Белок нектин-4 разбавляли до 2 мкг/мл покрывающим раствором CBS, 100 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Проводили однократное отмывание 300 мкл PBST, затем добавляли PBS (2% BSA) по 100 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Меченный биотином Nectin-1-hFc разбавляли PBS (2% BSA) до 20 мкг/мл. Определяемое антитело разводили PBS (2% BSA), при этом разведение 31HZ и 74HZ начинали с 3,73 мкг/мл, 3-кратное разведение и 9 точек концентрации, разведение 56HZ начинали с 1,25 мкг/мл, 2-кратное разведение и 10 точек концентрации. Два вышеуказанных разбавленных раствора тщательно перемешивали в равных объемах, а затем добавляли в соответствующие лунки по 100 мкл/лунку и проводили инкубацию при комнатной температуре в течение 2 часов. Проводили трехкратное отмывание 300 мкл PBST. HRP-стрептавидин разбавляли PBS (2% BSA) в соотношении 1:10000 и добавляли в соответствующую лунку по 100 мкл/лунку. Проводили инкубацию и при комнатной температуре в течение 1 часа. Проводили пятикратное отмывание 300 мкл PBST. В соответствующую лунку добавляли 100 мкл ТМВ, проявление окраски осуществляли при комнатной температуре в течение 10 минут, а затем останавливали добавлением 50 мкл 2 н H₂SO₄, и использовали ридер микропланшетов для сбора данных при 450 нм.

Результаты эксперимента представлены на Фигурах 7А и 7В, демонстрирующих, что 31HZ, 56HZ и 74HZ могут конкурентно ингибировать связывание человеческого нектина-4 с человеческим нектином-1, и их значения IC₅₀ при конкуренции составляли 27,62 нг/мл, 26,90 нг/мл, и 27,22 нг/мл соответственно, что сопоставимо с таковым для энфортумаба (27,11 нг/мл).

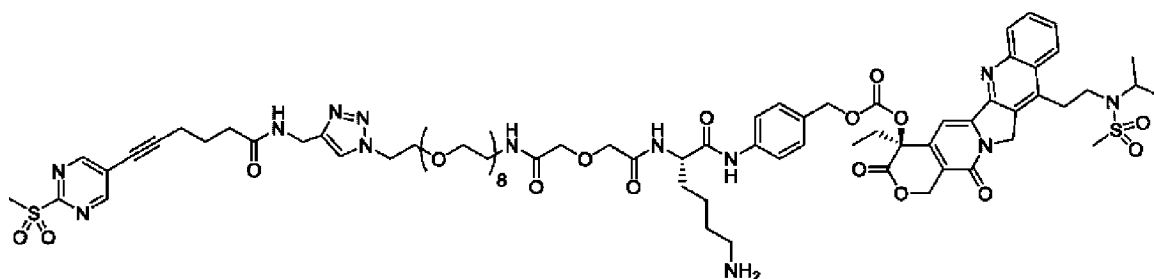
Пример 6: Определение специфичности гуманизированных моноклональных антител против нектина-4 человека

Семейство нектина включает представителей нектин-1, нектин-2, нектин-3 и нектин-4, и они обнаруживают идентичность последовательностей примерно на 25%, но имеют сходную структуру и функцию. Чтобы определить, распознают ли гуманизированные моноклональные антитела против человеческого нектина-4 только нектин-4 и не распознают нектин-1, нектин-2 и нектин-3, специфичность тестируемых антител определяли с помощью ELISA. Конкретные этапы были следующими. Человеческие антигены нектин-1, нектин-2, нектин-3 и нектин-4 разбавляли до 1 мкг/мл покрывающим раствором CBS, наносили на планшет для ELISA по 100 мкл на лунку и оставляли на ночь при 4°C. На следующий день жидкость в лунке удаляли и однократно отмывали 300 мкл PBS. Добавляли 100 мкл PBS (содержащего 2% BSA) и проводили блокирование при 37°C в течение 2 часов. Антитела 31HZ, 56HZ, 74HZ и энфортумаб разводили PBS (содержащим 2% BSA), отбирали по 100 мкл, добавляли в соответствующую лунку и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Отмывание проводили 3 раза по 300 мкл PBST; меченое HRP вторичное антитело козы против антитела человека разводили в соотношении 1:10000 PBS (содержащим 2% BSA), отбирали 100 мкл и добавляли в соответствующую лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Отмывание проводили 5 раз по 300 мкл PBST. В соответствующую лунку добавляли 100 мкл раствора для проявления окраски TMB и осуществляли проявление окраски при комнатной температуре в течение 5-20 минут. Для остановки реакции добавляли 50 мкл 2н H₂SO₄, для сбора показаний при оптической плотности 450 нм применяли ридер микропланшетов и данные использовали в программном обеспечении Graphpad Prism для подбора кривой.

Результаты эксперимента представлены на Фиг.8А, 8В и 8С, демонстрирующих, что все 31HZ, 56HZ и 74HZ специфически распознавали человеческий нектин-4, но не распознавали нектин-1, нектин-2 и нектин-3.

Пример 7: Получение ADC против нектина-4 человека

ADC против человеческого нектина-4 получали путем связывания TL001 с гуманизированным моноклональным антителом против человеческого нектина-4, где структура TL001 представлена формулой (1):



Формула (1)

Способ получения TL001 можно найти в заявке WO 2019/114666, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей полноте.

Способ приготовления конъюгата антитела против нектина-4 человека (ADC против нектина-4 человека) был следующим:

(1) Связывание: брали 30 мг гуманизированного моноклонального антитела против человеческого нектин-4, разбавляли разбавителем (20 mM PB+105 mM NaCl, pH 7,7), добавляли раствор эдетата натрия с конечной концентрацией 5 mM и тщательно перемешивали. Добавляли раствор TCEP (мольное отношение TCEP к антителу 4,4:1), тщательно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре 30 минут. TL001 (молярное отношение TL001 к антителу составляло 9:1), растворенный в диметилсульфоксиде, добавляли к вышеуказанному сочетанию растворов, тщательно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 2 часов для получения связанных образцов, которые были обозначены как 31HZ-TL001, 56HZ-TL001, 74HZ-TL001 и энфортумаб-TL001, соответственно. В ADC против человеческого нектин-4 производили замену буфера, а затем хранили в аликвотах при 4°C.

(2) Детекция:

Молекулярную массу ADC против нектин-4 человека анализировали с помощью LC-MS (жидкостная хроматография- масс-спектрометрия) в следующих условиях.

Условия хроматографии:

Колонка для жидкостной хроматографии: Thermo MAbPac RP 3,0×100 мм;

Подвижная фаза А: 0,1% FA/98% H₂O/2% ACN (ацетонитрил);

Подвижная фаза В: 0,1% FA/2% H₂O/98% ACN;

Скорость потока: 0,25 мл/мин; температура камеры образца: 8°C; температура колонки: 60°C; объем образца: 1 мкл;

Время (мин)	2	20	22	25	26	30
Подвижная фаза А (%)	75	60	5	5	75	75
Подвижная фаза В (%)	25	40	95	95	25	25

Переключающий клапан: 0-3 мин на сброс, 3-22 мин на МС, 22-30 мин на сброс

Условия масс-спектрометрии:

Модель масс-спектрометра: AB Sciex Triple TOF 5600+;

Параметры: GS1 35; GS2 35; CUR 30; TEM 350; ISVF 5500; DP 200; CE 10; m/z 600-4000; интервалы времени для суммирования 40.

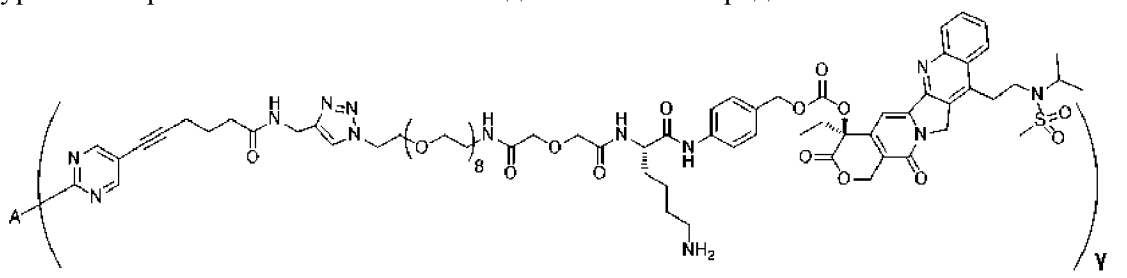
Теоретическая молекулярная масса и измеренная молекулярная масса легкой цепи и тяжелой цепи связанного анти-человеческого 31HZ-TL001 (тяжелая цепь рассчитана по основной гликоформе G0F) представлены в следующей таблице.

Пептидная цепь		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	Теоретическое значение (Да)	23987,65	25538,39	/	/	/
	Измеренное значение (Да)	23987,38	25539,03	/	/	/
HC	Теоретическое значение (Да)	50679,13	52529,15	54078,89	55628,62	57179,37
	Измеренное значение (Да)	N/D	52529,13	54079,31	55629,57	57180,06

Легкая цепь 31HZ-TL001 связана с токсинами от 0 до 1 (доли LC и DAR1 составили 0,1% и 99,9%, соответственно), а тяжелая цепь связана с токсинами от 0 до 4 (доли HC, DAR1, DAR2, DAR3 и DAR4 составили 0,0%, 2,0%, 10,2%, 86,1%, 1,8%, соответственно), поэтому соотношение лекарственное средство-антитело (DAR) (токсина к антителу) составило 7,75 в соответствии с расчетной формулой: $DAR = DAR1 \text{ легкой цепи} \times 2 + (DAR1 \times 1 + DAR2 \times 2 + DAR3 \times 3 + DAR4 \times 4) \text{ тяжелой цепи} \times 2$.

При использовании того же метода обнаруженные значения DAR для 56HZ-TL001, 74HZ-TL001 и энфортумаб-TL001 составили 7,71; 7,98 и 8,01, соответственно.

Согласно приведенным выше результатам масс-спектрометрического анализа, структура ADC против нектина-4 человека должна быть определена как:



где А представляет собой гуманизированное моноклональное антитело против человеческого нектина-4; γ относится к числу TL001, связанных с А путем образования тиоэфирной связи с тиоловой группой А, и представляет собой целое число от 1 до 10.

Энфортумаб-VC-MMAE получали путем связывания VC-MMAE с энфортумабом. Способы получения и детекции были такими же, как описано выше, и молярное соотношение антитела к VC-MMAE составило 1:5. Значение DAR для этой партии энфортумаба-VC-MMAE составило 5,09.

Пример 8: Определение литической активности ADC против человеческого нектина-4 на линии опухолевых клеток с высокой экспрессией человеческого нектина-4

Стабильная клеточная линия A549-Nectin-4 была выбрана для определения литической активности 31HZ-TL001, 74HZ-TL001 и энфортумаба-TL001 на клеточных линиях с высокой экспрессией человеческого нектина-4. Конкретные экспериментальные этапы были следующими. Клетки A549-Nectin-4 получали расщеплением, затем собирали центрифугированием, ресуспендировали до 100 000/мл в среде DMEM+4% FBS и распределяли по 100 мкл/лунку клеток в 96-луночном планшете. Молекулы ADC разбавляли по градиенту основной средой DMEM, начиная с конечной концентрации 150 мкг/мл, 4-кратное разведение, 11 точек концентрации, и добавляли в соответствующие лунки по 100 мкл на лунку, причем конечная концентрация сыворотки составляла 2%. Инкубацию проводили в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 часов. Добавляли ССК8 (Rhinogen) по 20 мкл на лунку и инкубировали в течение 0,5-2,5 часов в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. Показания OD450 нм определяли на ридере микропланшетов (MD) каждые полчаса и помещали в программное обеспечение Graphpad Prism для подбора кривой.

Результаты эксперимента представлены на Фигурах 9А и 9В, демонстрирующих, что 31HZ-TL001, 74HZ-TL001 и энфортумаб-TL001 могут эффективно уничтожать клетки A549-Nectin-4 со значениями EC_{50} 1390 нг/мл, 1364 нг/мл и 2049 нг/мл, соответственно. Было показано, что литическая активность 31HZ-TL001 и 74HZ-TL001 в отношении линий опухолевых клеток с высокой экспрессией человеческого нектина-4 была лучше, чем у энфортумаба-TL001; при этом значения EC_{50} литической активности 31HZ-TL001, 74HZ-TL001 и Энфортумаба-TL001 на клетках A549 без сверхэкспрессии нектина-4 человека составили 5982 нг/мл, 6251 нг/мл и 5604 нг/мл, соответственно. В целом, с точки зрения литической активности в отношении клеток A549-Nectin-4 и клеток A549, 31HZ-TL001, 74HZ-TL001 и энфортумаб-TL001 являются специфичными в отношении нектина-4.

Литическую активность 31HZ-TL001 и 56HZ-TL001 в отношении клеточной линии T24-Nectin-4 с высокой экспрессией человеческого нектина-4 определяли тем же экспериментальным методом, который описан выше. Результаты эксперимента представлены на Фигурах 9С и 9D, которые показывают, что как 31HZ-TL001, так и 56HZ-TL001 могут эффективно уничтожать клетки T24-Nectin-4, а их значения EC_{50} составляют 1277 нг/мл и 1568 нг/мл, соответственно, демонстрируя, что литическая активность этих двух ADC была практически эквивалентной. Значения EC_{50} литической активности 31HZ-TL001 и 56HZ-TL001 на клетках T24 без сверхэкспрессии человеческого нектина-4 составляли 2884 нг/мл и 3665 нг/мл, соответственно, и эти литические активности были значительно слабее, чем на клетках T24-Nectin-4, указывая, что литический эффект обоих ADC был специфичен для нектина-4.

Пример 9: Определение литической активности ADC против человеческого нектина-4 на линии опухолевых клеток, эндогенно экспрессирующих человеческий нектин-4

Линия опухолевых клеток T47D была выбрана для определения литической активности 31HZ-TL001, 74HZ-TL001 и энфортумаба-TL001 в отношении линии опухолевых клеток, эндогенно экспрессирующих нектин-4 человека. Конкретные экспериментальные этапы были следующими. Клетки T47D получали расщеплением, затем собирали центрифугированием, ресуспендировали до 100 000/мл в среде 1640+4% FBS и распределяли по 100 мкл/лунку клеток в 96-луночном планшете. Молекулы ADC разводили по градиенту основной средой 1640, начиная с конечной концентрации 150 мкг/мл, 4-кратное разведение, 11 точек концентрации, и добавляли в соответствующие лунки по 100 мкл на лунку. Конечная концентрация сыворотки составила 2%. Инкубацию проводили в инкубаторе при 37°C, 5% CO_2 в течение 72 часов. Добавляли ССК8 (Rhinogen) по 20 мкл на лунку и инкубировали в течение 0,5-2,5 часов в инкубаторе при 37°C, 5% CO_2 . Показания OD450 нм собирали на ридере микропланшетов (MD) каждые полчаса и помещали в программное обеспечение Graphpad Prism для побора кривой.

Результаты эксперимента представлены на Фигуре 10А, демонстрирующей, что 31HZ-TL001, 74HZ-TL001 и Энфортумаб-TL001 могут эффективно уничтожать клетки

T47D со значениями EC_{50} 206,1 нг/мл, 611,3 нг/мл и 229,2 нг/мл, соответственно. Показано, что литическая активность 31HZ-TL001 в отношении клеток T47D была сравнима с активностью энфортумаба-TL001.

Литическую активность 31HZ-TL001, 74HZ-TL001 и энфортумаба-TL001 в отношении линии опухолевых клеток MDA-MB-468, эндогенно экспрессирующих человеческий нектин-4, определяли тем же экспериментальным методом, который описан выше. Результаты эксперимента представлены на Фигуре 10В, которая показывает, что 31HZ-TL001, 74HZ-TL001 и энфортумаб-TL001 могут эффективно уничтожать клетки MDA-MB-468, а их значения EC_{50} составляют 1030 нг/мл, 2277 нг/мл и 1190 нг/мл, соответственно, показывая, что литическая активность 31HZ-TL001 в отношении клеток MDA-MB-468 была сравнима с активностью энфортумаба-TL001.

Литическую активность 31HZ-TL001 и 56HZ-TL001 в отношении линии опухолевых клеток NCI-N87, эндогенно экспрессирующих человеческий нектин-4, определяли тем же экспериментальным методом, который описан выше. Результаты эксперимента представлены на Фигуре 10С, которая показывает, что как 31HZ-TL001, так и 56HZ-TL001 могут эффективно уничтожать клетки NCI-N87, а их значения EC_{50} составляют 9376 нг/мл и 10935 нг/мл, соответственно, свидетельствуя, что их литическая активность была практически эквивалентной.

В заключение, литическая активность 31HZ-TL001 и 56HZ-TL001 в отношении линий опухолевых клеток, эндогенно экспрессирующих человеческий нектин-4, была, по существу, эквивалентна активности энфортумаба-TL001.

Пример 10: Фармакодинамический анализ *in vivo* ADC против нектина-4 человека на модели CDX

Противоопухолевый эффект молекул ADC оценивали путем конструирования модели CDX клеточной линии немелкоклеточного рака легкого человека NCI-H322М. Конкретные этапы были следующими: клетки NCI-H322М культивировали в среде RPMI1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) при 37°C и 5% CO₂. Клетки в фазе экспоненциального роста собирали, ресуспендировали в PBS и инокулировали подкожно самкам мышей NOD/SCID (Biocytogen Jiangsu Gene Biotechnology Co., Ltd.) в дозе 1×10^7 /мышь (суспендировали в 0,1 мл PBS) для получения модели подкожного ксенотрансплантата опухоли. Когда средний объем опухоли достигал 70-100 мм³, мышей разделяли на группы в соответствии с объемом опухоли, по 5 мышей в каждой группе. День разделения на группы был обозначен как День 0, и группы включали группу носителя (физиологический раствор) (отрицательный контроль), группы 31HZ-TL001 (3 мг/кг и 10 мг/кг), группы 56HZ-TL001 (3 мг/кг и 10 мг/кг), группу энфортумаб-TL001 (10 мг/кг) и группу энфортумаб-VC-MMAE (10 мг/кг). Все образцы вводили путем инъекции в хвостовую вену два раза в неделю, всего 6 доз.

Диаметры опухолей измеряли штангенциркулем два раза в неделю после введения, а объем опухоли рассчитывали по следующей формуле: $V = 0,5 \times a \times b^2$, где a и b

представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно. Смерть животных наблюдали и регистрировали ежедневно.

Для расчета скорости ингибирования роста опухоли TGI (%), которую использовали для оценки эффективности ингибирования опухоли, применяли следующую формулу:

$$TGI (\%) = [1 - (V_{T-end} - V_{T-start}) / (V_{C-end} - V_{C-start})] * 100\%$$

где:

V_{T-end} : средний объем опухоли в опытной группе в конце эксперимента;

$V_{T-start}$: средний объем опухоли в опытной группе в начале введения;

V_{C-end} : средний объем опухоли в группе отрицательного контроля в конце эксперимента;

$V_{C-start}$: средний объем опухоли в группе отрицательного контроля в начале введения.

Результаты эксперимента представлены в Таблице 9 и на Фигурах 11 и 12, которые показали, что 31HZ-TL001, 56HZ-TL001, энфортумаб-TL001 и энфортумаб-VC-MMAE оказывали значительное ингибирующее действие на рост опухоли на модели ксенотрансплантата опухоли NCI-H322M дозозависимым образом. После 6 доз (день 21) по сравнению с группой отрицательного контроля при уровне дозы 10 мг/кг значения TGI 31HZ-TL001, 56HZ-TL001, энфортумаб-TL001 и энфортумаб-VC-MMAE составили 155,79%; 163,56%; 156,31% и 173,79%, соответственно. Во всех опытных группах за период наблюдения не обнаруживалось значительной потери массы тела, что свидетельствует о хорошей переносимости ADC животными.

Таблица 9: NCI-H322M+NOD/SCID мышьяная модель CDX

Группа	День 21				
	Доза (мг/кг)	Объем опухоли (мм ³) ($\bar{x} \pm SEM$)	TGI (%)	Регрессия опухоли (PR/CR)	Значение P
Контрольный растворитель	10	347,06±25,84	/	(0/0)	/
31HZ-TL001	3	119,96±32,99	90,61	(1/0)	< 0,001
31HZ-TL001	10	42,92±3,00	155,79	(5/0)	< 0,001
56HZ-TL001	3	100,12±25,64	98,33	(4/0)	< 0,001
56HZ-TL001	10	35,53±2,12	163,56	(5/0)	< 0,001
Энфортумаб-TL001	10	42,62±5,38	156,31	(5/0)	< 0,001
Энфортумаб-VC- MMAE	10	25,47±4,70	173,79	(5/0)	< 0,001

Примечание: TGI: скорость ингибирования роста опухоли; PR: частичная регрессия опухоли; CR: полная регрессия опухоли. Значение P было результатом сравнения с группой, получавшей контрольный растворитель.

Приведенные выше результаты показали, что, учитывая значения TGI 31HZ-TL001 и 56HZ-TL001 при уровнях доз 3 мг/кг и 10 мг/кг, как 31HZ-TL001, так и 56HZ-TL001

могут эффективно ингибировать рост опухоли дозозависимым образом. При уровне дозы 10 мг/кг как 31HZ-TL001, так и 56HZ-TL001 могли вызывать частичную регрессию опухоли у всех 5 мышей в группе, а эффективность была в основном эквивалентна эффективности энфортумаба-TL001 и энфортумаба-VC-MMAE. Кроме того, 31HZ-TL001 и 56HZ-TL001 хорошо переносились мышами-опухоленосителями.

Пример 11: Фармакодинамические свойства *in vivo* ADC антител против нектин-4 человека на модели PDX

Опухолевая ткань была собрана из ксенотрансплантата рака мочевого пузыря HuPrime® модельных мышей BL9200 (Crown Bioscience (Taicang) Co., Ltd.), обладающего высокой экспрессией нектин-4 и полученного от 63-летнего пациента мужского пола (ксенотрансплантат PDX). Опухолевую ткань разрезали на кусочки размером 3×3×3 мм и инокулировали подкожно в передний отдел правой лопатки мышей NOD/SCID (Jiangsu Jicui Yaokang Biotechnology Co., Ltd.). Когда средний объем опухоли у мышей-опухоленосителей достигал примерно 150-250 мм³, мышей случайным образом делили на группы в соответствии с размером опухоли, по 7 мышей в каждой группе, а день разделения на группы определяли как день 0. Всего было 4 группы: группа, получавшая изотипический контроль человеческого IgG1 (IgG1 3 мг/кг, отрицательный контроль); группа, получавшая человеческий IgG1-TL001 (сокращенно IgG1-TL001, 3 мг/кг; см. Пример 7 для получения сведений о способе приготовления); группы, получавшие 1 мг/кг и 3 мг/кг 56HZ-TL001. Все образцы вводили путем инъекции в хвостовую вену два раза в неделю, всего 6 доз. После введения наблюдали и периодически измеряли объем опухоли и массу тела мышей, а методы измерения и расчета были такими, как описано в Примере 10.

Результаты эксперимента представлены в Таблице 10 и на Фигурах 13 и 14. После 6 доз (день 20) по сравнению с группой отрицательного контроля, получавшей 3 мг/кг человеческого IgG1 (hIgG1), 56HZ-TL001 в дозе 3 мг/кг показал ингибирующее действие. TGI 105,55% ($P < 0,05$) для роста опухоли, и частичная регрессия опухолей наблюдалась у 4 мышей этой группы. 56HZ-TL001 в дозе 3 мг/кг продемонстрировал значительно улучшенный ингибирующий эффект в отношении роста опухоли, по сравнению с ADC изотипического контроля (hIgG1-TL001 в дозе 3 мг/кг) ($P < 0,001$) в той же дозе. Одна мышь умерла в группе hIgG1, а в других группах с нормальной активностью гибели мышей не наблюдалось. В течение периода введения масса тела мышей в каждой группе несколько снижалась, при этом масса тела в группе IgG1 снижалась больше всего из-за отсутствия эффективного лечения, свидетельствуя, что мыши-опухоленосители хорошо переносили ADC.

Приведенные выше результаты показали, что 56HZ-TL001 обладает значительным ингибирующим эффектом в отношении роста опухоли на модели BL9200 ксенотрансплантата PDX рака мочевого пузыря. Кроме того, мыши-опухоленосители хорошо переносили 56HZ-TL001.

Таблица 10: Модель PDX рака мочевого пузыря HuPrime® на мышах NOD/SCID

Группа	Доза (мг/ кг)	День 20				
		Объем опухоли (мм ³) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	TGI (%)	Регресс ия опухол и (PR/CR)	Значение Р (по отношени ю к hIgG1)	Значение Р (по отношению к hIgG1-TL001)
hIgG1	3	1379,58±221,96	/	0/0	/	/
hIgG1-TL001	3	926,31±163,85	37,47	0/0	> 0,05	/
56HZ-TL001	3	101,71±16,78	105,55	4/0	< 0,001	< 0,001

Примечание: TGI: скорость ингибирования роста опухоли; PR: частичная регрессия опухоли; CR: полная регрессия опухоли; /: не применяется.

Хотя конкретные варианты осуществления настоящего изобретения были подробно описаны, специалистам в данной области техники будет понятно, что в свете всех описанных принципов могут быть выполнены различные модификации и варианты, и что все эти изменения находятся в рамках объема настоящего изобретения. Объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Список последовательностей

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
1	31# VH	EVQLQQPGADLVRPGASVKLSCKASGYTFTD YWMNWVKLRPGQGLEWIGMIHPSDSETRLN QKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSA VYYCARWDFRIYYAMDYWGQGTSTVTVSS
2	31# VL	DVVITQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLN TNSQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRES GVPDRFIGSGSGTDFLTITSVQAEDLADYFC QQHYSTPLTFGAGTKLEIK
3	Chothia 31#/31HZ CDR-H1	GYTFTDY
4	Chothia 31#/31HZ CDR-H2	HPSDSE
5	Chothia/Abm/ Kabat 31#/31HZ CDR-H3	WDFRIYYAMDY
6	Chothia/Abm/ Kabat 31#/31HZ CDR-L1	KSSQSLLNTNSQKNYLA
7	Chothia/Abm/ Kabat 31#/31HZ CDR-L2	FASTRES
8	Chothia/Abm/ Kabat/IMGT 31#/31HZ/74#/74HZ CDR-L3	QQHYSTPLT
9	Abm 31#/31HZ CDR-H1	GYTFTDYWMN
10	Abm 31#/31HZ CDR-H2	MIHPSDSETR
11	Kabat 31#/31HZ CDR-H1	DYWMN
12	Kabat 31# CDR-H2	MIHPSDSETRLNQKFKD
13	IMGT 31#/31HZ CDR-H1	GYTFTDYW
14	IMGT 31#/31HZ CDR-H2	IHPSDSET
15	IMGT 31# /31HZ CDR-H3	ARWDFRIYYAMDY
16	IMGT 31# /31HZ CDR-L1	QSLLNTNSQKNY
17	IMGT 31#/31HZ CDR-L2	FAS

18	Chothia 56HZ CDR-H1	GYFNSITS DY
19	56# VH	QVQLKESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSD YDWHWIRHFPGNMLEWMGYISFSGRTYYNP SLKSRISITHDTSKNHFFLRRLNSVTTEDTATYY CARGNYDGF DYWGQGTTLTVSS
20	56# VL	DIQLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQNIGTSIH WYQHRTNGSPRLLIKFASESISGIPSRFSGSGS GTDFTLINSVESEDIADYYCQQSKSWPTYTF GGGTKLEIK
21	Chothia 56# CDR-H1	GYSITS DY
22	Chothia 56#/56HZ CDR-H2	SFSGR
23	Chothia/Abm/ Kabat 56#/56HZ CDR-H3	GNYDGF DY
24	Chothia/Abm/ Kabat 56#/56HZ CDR-L1	RASQNIGTSIH
25	Chothia/Abm/ Kabat 56#/56HZ CDR-L2	FASESIS
26	Chothia/Abm/ Kabat/IMGT 56#/56HZ CDR-L3	QQSKSWPTYT
27	Abm 56# CDR-H1	GYSITS DYDWH
28	Abm 56#/56HZ CDR-H2	YISFSGRTY
29	Kabat 56# CDR-H1	SDYDWH
30	Kabat 56#/56HZ CDR-H2	YISFSGRTYYNP SLKS
31	IMGT 56# CDR-H1	GYSITS DYD
32	IMGT 56#/56HZ CDR-H2	ISFSGRT
33	IMGT 56#/56HZ CDR-H3	ARGNYDGF DY
34	IMGT 56#/56HZ CDR-L1	QNIGTS
35	IMGT 56#/56HZ CDR-L2	FAS
36	Abm 56HZ CDR-H1	GYFNSITS DYDWH
37	74# VH	EVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFIN YWMNWVKQRPGQGLEWIGMIHPSDSATRLN QKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSA VYYCARWGNFYTVNAWYYFDYWGHTTLT VSS
38	74# VL	DIVITQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQTLLNS NTQKNYLA WYQQKPGQSPKLLFYFASTRESG VPDRFIGSGSGTNFTLTISVQAEDLADYFCQ QHYSTPLTFGAGTKLEIK
39	Chothia 74#/74HZ CDR-H1	GYTFIN Y
40	Chothia 74#/74HZ CDR-H2	HPSDSA
41	Chothia/Abm/ Kabat 74#/74HZ CDR-H3	WGNFYTVNAWYYFDY
42	Chothia/Abm/ Kabat 74#/74HZ CDR-L1	KSSQTLLNSNTQKNYLA
43	Chothia/Abm/ Kabat 74#/74HZ CDR-L2	FASTRES
44	Kabat 56HZ CDR-H1	ITS DYDWH
45	Abm 74#/74HZ CDR-H1	GYTFIN YWMN
46	Abm 74#/74HZ CDR-H2	MIHPSDSATR

47	Kabat 74#/74HZ CDR-H1	NYWMN
48	Kabat 74#CDR-H2	MIHPSDSATRLNQKFKD
49	IMGT 74#/74HZ CDR-H1	GYTFINYW
50	IMGT 74#/74HZ CDR-H2	IHPSDSAT
51	IMGT 74#/74HZ CDR-H3	ARWGNFYTVNAWYYFDY
52	IMGT 74#/74HZ CDR-L1	QTLLNSNTQKNY
53	IMGT 74#/74HZ CDR-L2	FAS
54	IMGT 56HZ CDR-H1	GYFNSITSDYD
55	31HZ VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTD YWMNWVRLAPGQGLEWIGMIHPSDSETRLN QKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARWDFRIYYAMDYWGQGTLLTVSS
56	31HZ VL	DVVITQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNT NSQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFC QQHYSTPLTFGGGTKVEIK
57	56 HZ VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYFNSIT SDYDWHWIRHHPGKGLEWMGYISFSGRTYY NPSLKSRVTISHDTSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARGNYDGFYDWGQGTLLTVSS
58	56HZ VL	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNIGTSI HWYQHKPGQSPRLLIKFASESISGIPARFSGSG SGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQSKSWPTYT FGGGTKVEIK
59	74HZ VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFIN YWMNWVRQAPGQGLEWIGMIHPSDSATRLN QSFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARWGNFYTVNAWYYFDYWGQGTLLTV VSS
60	74HZ VL	DIVITQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTLLNSN TQKNYLAWYQQKPGQSPKLLFYFASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQ HYSTPLTFGQGTKLEIK
61	Константная область тяжелой цепи IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
62	Константная область легкой цепи каппа	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
63	Kabat 31HZ CDR-H2	MIHPSDSETRLNQKFQG
64	Kabat 74HZ CDR-H2	MIHPSDSATRLNQSFQG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нектином-4, включающие:

(1a)

следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:3, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:4, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант; и/или

следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia:

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант;

или

(1b)

следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:9, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:10, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант; и/или

следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm:

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант;

или

(1c)

следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:11, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:12 или 63, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант; и/или

следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat:

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант;

или

(1d)

следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:14, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:15, или ее вариант; и/или

следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT:

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:16, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант;

или

(2a)

следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:21 или 18, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант; и/или

следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia:

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант;

или

(2b)

следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:27 или 36, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:28, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант; и/или

следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm:

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант;

или

(2c)

следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:29 или 44, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:30, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант; и/или

следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat:

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант;

или

(2d)

следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGTi:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:31 или 54, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:32, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:33, или ее вариант; и/или

следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT:

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:34, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант;

или

(3a)

следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:39, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:40, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант; и/или

следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia:

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант;

или

(3b)

следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:45, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:46, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант; и/или

следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Abm:

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант;

или

(3c)

следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в NO:47, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:48 или 64, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант; и/или

следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat:

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант;

или

(3d)

следующие три CDRs тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:49, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:50, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:51, или ее вариант; и/или

следующие три CDRs легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT:

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:52, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:53, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант,

где вариант имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2 или 3 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит, предпочтительно замена является консервативной заменой;

предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат каркасную область, происходящую из человеческого или мышинового иммуноглобулина;

предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с нектином-4 человека.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающие:

(а) следующие шесть CDRs тяжелой и легкой цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:3, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:4, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант,

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант, или

(b) следующие шесть CDRs тяжелой и легкой цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Abm:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:9, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:10, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант,

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:7 или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант, или

(c) следующие шесть CDRs тяжелой и легкой цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:11, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:12 или 63, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или ее вариант,

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:7, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант, или

(d) следующие шесть CDRs тяжелой и легкой цепей, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:14, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:15, или ее вариант,

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:16, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант,

где вариант имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2 или 3 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит, предпочтительно замена является консервативной заменой.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающие:

(а) следующие шесть CDRs тяжелой и легкой цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:21 или 18, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант,

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант, или

(b) следующие шесть CDRs тяжелой и легкой цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Abm:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:27 или 36, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:28, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант,

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант, или

(c) следующие шесть CDRs тяжелой и легкой цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:29 или 44, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:30, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, или ее вариант,

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант, или

(d) следующие шесть CDRs тяжелой и легкой цепей, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:31 или 54, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:32, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:33, или ее вариант,

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:34, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:26, или ее вариант,

где вариант имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2 или 3 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит, предпочтительно замена является консервативной заменой.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающие:

(a) следующие шесть CDRs тяжелой и легкой цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Chothia:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:39, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:40, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант,

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант; или

(b) следующие шесть CDRs тяжелой и легкой цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Abm:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:45, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:46, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант,

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант; или

(c) следующие шесть CDRs тяжелой и легкой цепей, определенные в соответствии с системой нумерации Kabat:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:47, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:48 или 64, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, или ее вариант,

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:43, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант; или

(d) следующие шесть CDRs тяжелой и легкой цепей, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT:

CDR-H1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:49, или ее вариант,

CDR-H2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:50, или ее вариант,

CDR-H3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:51, или ее вариант,

CDR-L1, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:52, или ее вариант,

CDR-L2, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:53, или ее вариант,

CDR-L3, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, или ее вариант,

где вариант имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2 или 3 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит, предпочтительно замена является консервативной заменой.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, включающие:

VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:55, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:56, или ее вариант; или

VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:57, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:20 или SEQ ID NO:58, или ее вариант; или

VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:37 или SEQ ID NO:59, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:60, или ее вариант;

где вариант имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью, из которой он происходит, или имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит, предпочтительно замена является консервативной заменой.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, включающие:

(1) VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:2, или ее вариант; или

(2) VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:20, или ее вариант; или

(3) VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, или ее вариант; или

(4) VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:55, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:56, или ее вариант; или

(5) VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:57, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:58, или ее вариант; или

(6) VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:59, или ее вариант, и/или VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:60, или ее вариант;

где вариант имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью, из которой он происходит, или имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью, из которой он происходит, предпочтительно замена является консервативной заменой.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, которые представляют собой мышиное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, дополнительно содержащие:

константную область тяжелой цепи иммуноглобулина человека или ее вариант и константную область легкой цепи или ее вариант, где вариант имеет замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление до 20, до 15, до 10 или до 5 аминокислот, например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью дикого типа, из которой она происходит;

предпочтительно константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи IgG, такую как константная область тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, а константная область легкой цепи выбрана из константной области легкой цепи κ или λ ;

более предпочтительно константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи IgG1;

наиболее предпочтительно константная область тяжелой цепи имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи κ , и/или константная область легкой цепи имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:62.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где:

(а) тяжелая цепь включает VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, а легкая цепь включает VL, имеющую последовательность, указанную в

SEQ ID NO:2, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62; или

(b) тяжелая цепь включает VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, а легкая цепь включает VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:20, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62; или

(c) тяжелая цепь включает VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, а легкая цепь включает VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62; или

(d) тяжелая цепь включает VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:55, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, а легкая цепь включает VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:56, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62; или

(e) тяжелая цепь включает VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:57, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, а легкая цепь включает VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:58, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62; или

(f) тяжелая цепь включает VH, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:59, и константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, а легкая цепь включает VL, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:60, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:62.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, выбранные из группы, состоящей из scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv фрагмента, стабилизированного дисульфидной связью Fv (dsFv), диатела, биспецифического антитела и полиспецифического антитела.

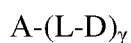
11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, которые связываются с доменом IgV нектин-4.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, конъюгированные по меньшей мере с одной меткой, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из фермента, флуоресцентного красителя, радиоизотопа, биотина и коллоидного золота.

13. Конъюгат антитела, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11 и по меньшей мере один терапевтический агент.

14. Конъюгат антитела по п.13, где терапевтический агент представляет собой цитотоксический агент.

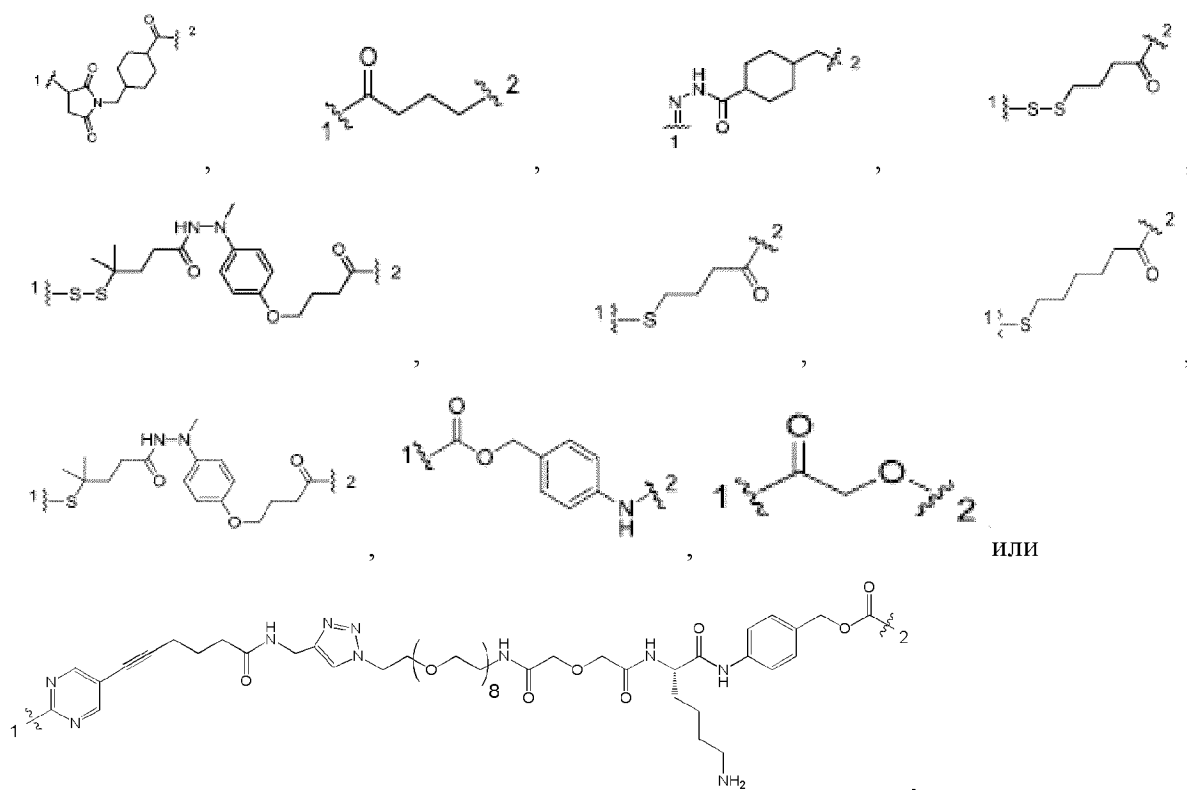
15. Конъюгат антитела по п.13 или п.14, который имеет структуру, представленную Формулой (I),



(I);

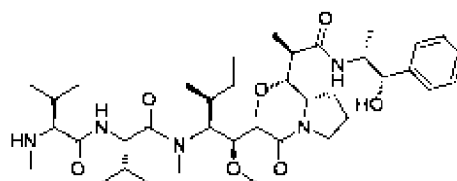
где А представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11;

L включает аминокислоту или пептид, состоящий из 2-10 аминокислот; более предпочтительно L выбран из Val, Cit, Phe, Lys, D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn,

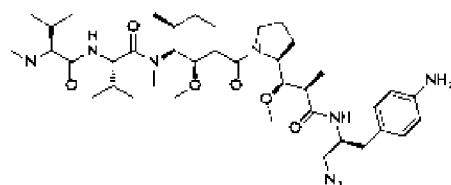
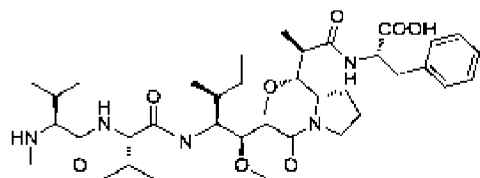


при этом одно из положений 1 и 2 представляет собой положение, в котором соединены L и A, а другое представляет собой положение, в котором соединены L и D, причем

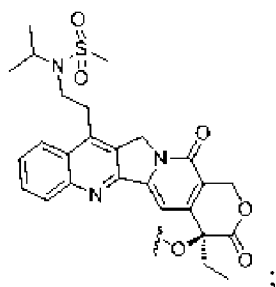
Д выбран из группы, состоящей из цитотоксических агентов, терапевтических антител, радиоизотопов, олигонуклеотидов и их аналогов, биологически активных пептидов, белковых токсинов и ферментов, предпочтительно Д представляет собой молекулу с противоопухолевой биологической активностью;



более предпочтительно, D представляет собой

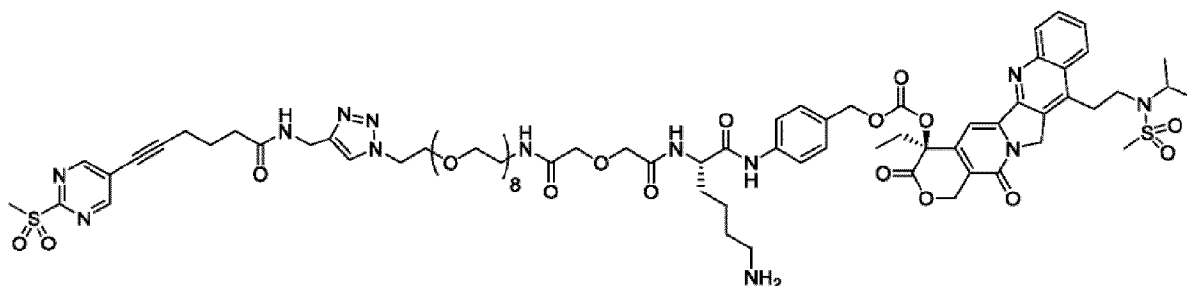


или



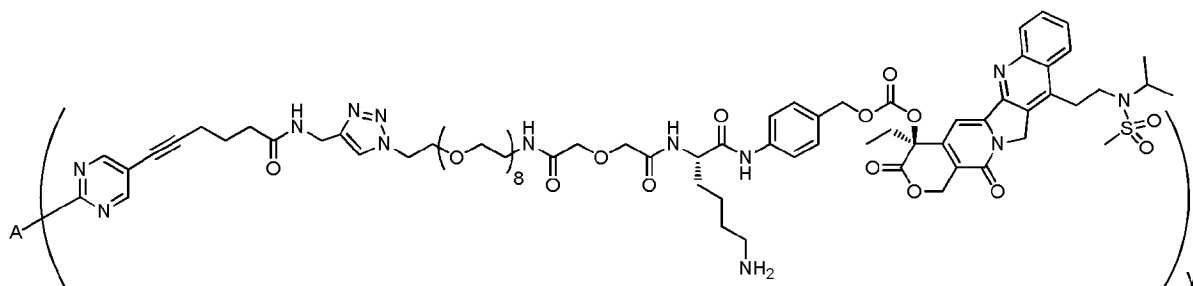
а γ представляет собой целое число от 1 до 10.

16. Конъюгат антитела по п.15, где фрагмент (L-D) имеет структуру, представленную Формулой (1), которая связана путем образования тиоэфирной связи с сульфгидрильной группой А,



Формула (1),

причем конъюгат антитела имеет структуру, представленную Формулой (2):



Формула (2),

где γ представляет собой целое число от 1 до 10, а А представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11.

17. Конъюгат антитела по п.13, где терапевтический агент представляет собой радиоизотоп, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{131}I , ^{125}I , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{90}Y .

18. Композиция, содержащая конъюгат антитела по любому из пп.13-17, где молярное отношение (значение DAR) терапевтического агента к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту в композиции представляет собой десятичное или целое число от 1 до 10 (например, десятичное или целое число от 1 до 8, такое как 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,1; 3,2; 3,3; 3,4; 3,5; 3,6; 3,7; 3,79; 3,8; 3,9; 4,0; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 5,0; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 6,95; 7,0; 7,03; 7,1; 7,12; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9 или 8,0).

19. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, трансмембранный домен и один или несколько внутриклеточных Т-клеточных сигнальных доменов.

20. Иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая на поверхности CAR по п.19, предпочтительно, выбранная из группы, состоящей из цитотоксических Т-клеток, натуральных киллерных клеток и натуральных киллерных Т-клеток.

21. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11.

22. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.21.

23. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.21 или вектор экспрессии по п.22, предпочтительно представляющая собой эукариотическую клетку, более предпочтительно клетку млекопитающего, наиболее предпочтительно клетку яичника китайского хомячка, или предпочтительно клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку, более предпочтительно клетка-хозяин представляет собой *Escherichia coli*.

24. Полиспецифическое антитело, включающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11 и по меньшей мере одно другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или аналог антитела, так что полиспецифическое антитело способно связываться с нектином-4 и по меньшей мере с еще одним антигеном, предпочтительно полиспецифическое антитело является биспецифическим, триспецифическим или тетраспецифическим антителом.

25. Слитый белок, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11 и дополнительный биологически активный полипептид, причем предпочтительно дополнительный биологически активный полипептид представляет собой полипептид или белок, обладающий терапевтической активностью, связывающей активностью или ферментативной активностью.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, конъюгат антитела по любому из пп.13-17, композицию по п.18, иммунную эффекторную клетку по п.20,

полиспецифическое антитело по п.24 или слитый белок по п.25 и фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

27. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11, конъюгата антитела по любому из пп.13-17, композиции по п.18, иммунной эффекторной клетки по п.20, полиспецифического антитела по п.24, слитого белка по п.25 или фармацевтической композиции по п.26 в производстве лекарственного средства, применяемого для лечения рака, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из рака желудка, рака печени, печеночно-клеточного рака, рака мочевого пузыря, уротелиального рака, рака уретры, рака почечной лоханки, рака мочеточника, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, протокового рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака головы и шеи, рака толстой кишки, рака прямой кишки и рака пищевода.

28. Применение по п.27, где лекарственное средство используют в комбинации с одним или несколькими терапевтическими агентами, выбранными из группы, состоящей из противоопухолевых агентов, химиотерапевтических агентов, радиоизотопов, ингибиторов иммунной контрольной точки.

29. Применение по п.27, где лекарственное средство используют в комбинации с одним или несколькими терапевтическими схемами, выбранными из группы, состоящей из хирургии, лучевой терапии, химиотерапии, таргетной терапии, иммунотерапии, гормональной терапии, ингибирования ангиогенеза и паллиативной терапии.

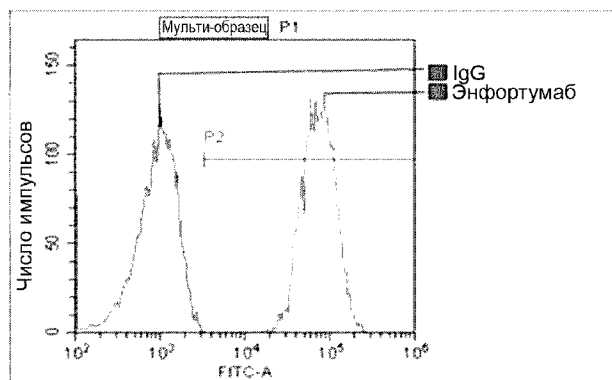
30. Способ детекции присутствия или определения уровня экспрессии нектин-4 в образце, включающий:

(a) обеспечение контактирования образца с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-11, и

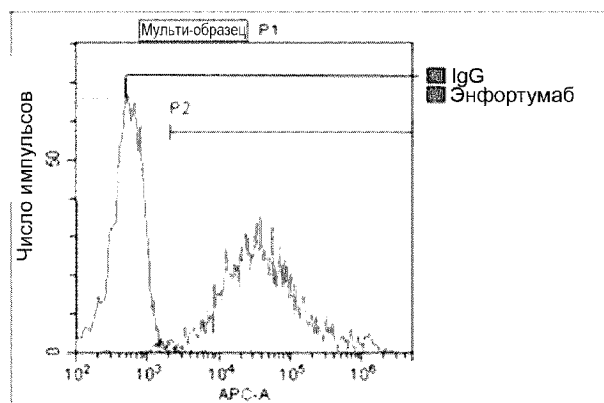
(b) выявление образования или определение количества иммунного комплекса антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и нектин-4 в образце для того, чтобы обнаружить присутствие или определить уровень экспрессии нектин-4 в образце.

По доверенности

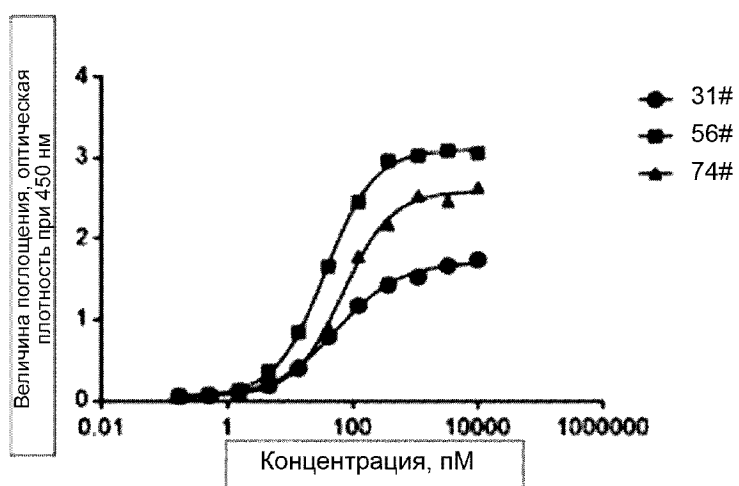
1/16



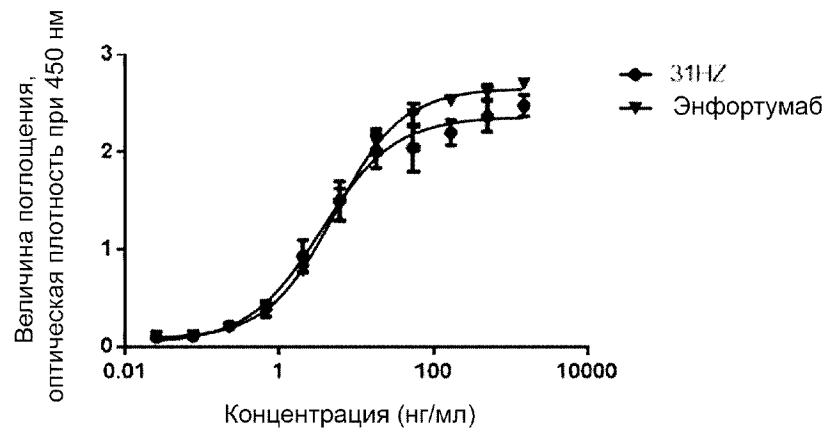
Фиг. 1А



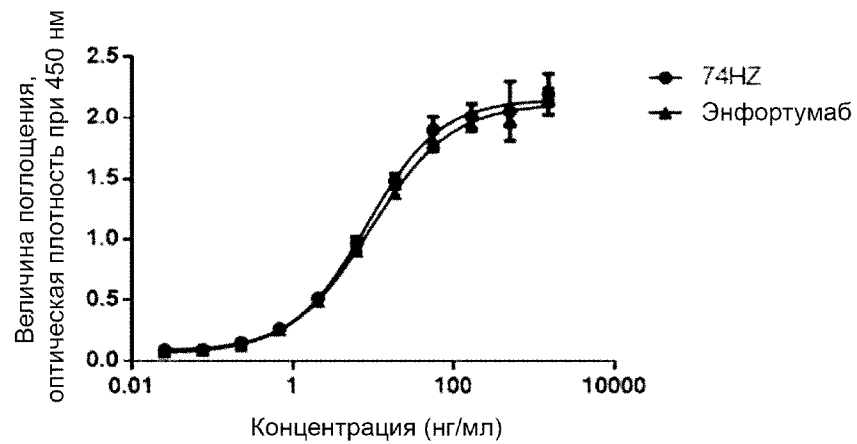
Фиг. 1В



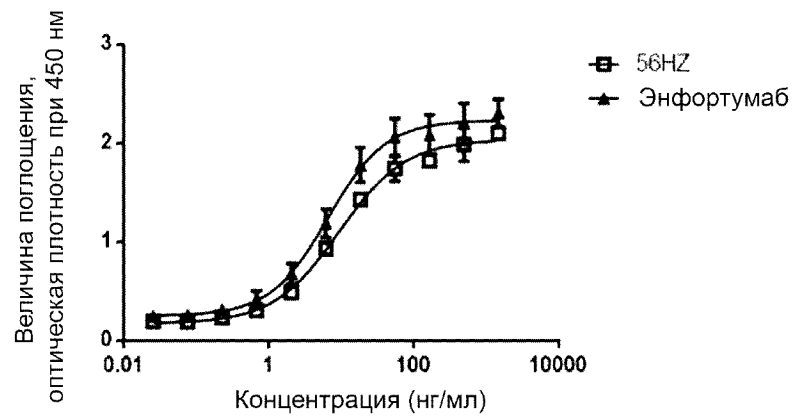
Фиг. 2



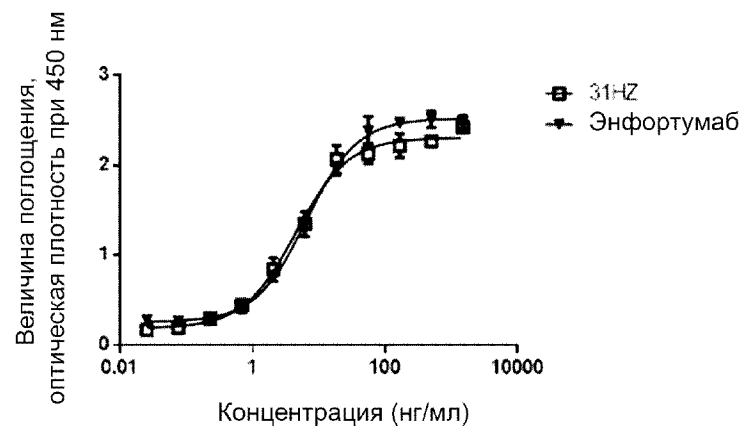
Фиг. 3А



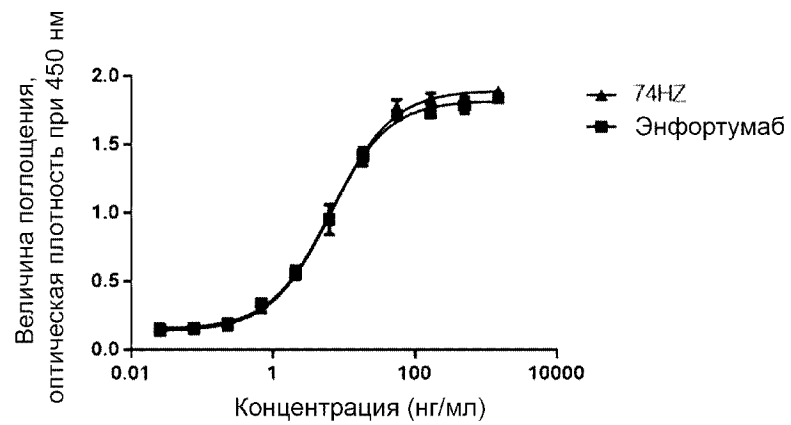
Фиг. 3В



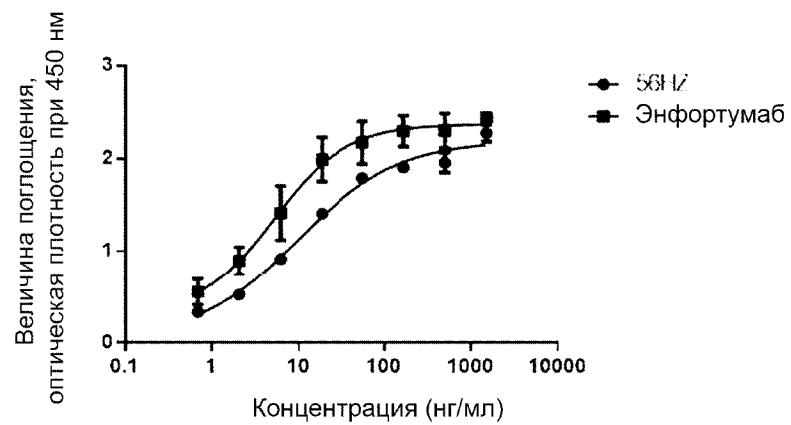
Фиг. 3С



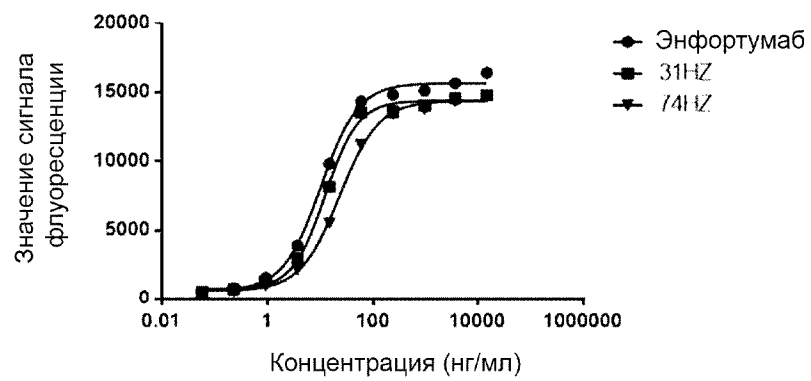
Фиг. 3D



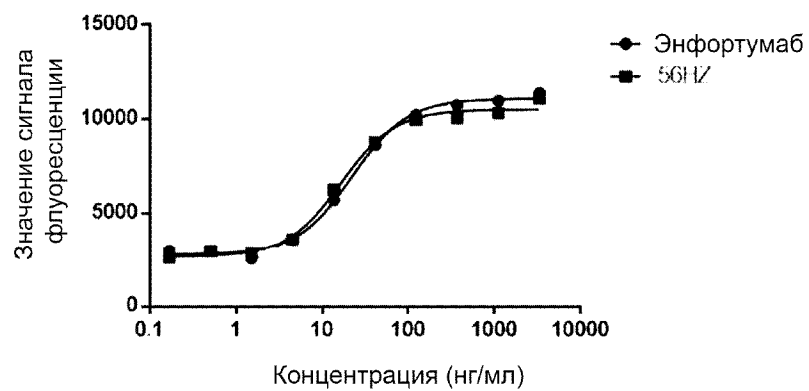
Фиг. 3Е



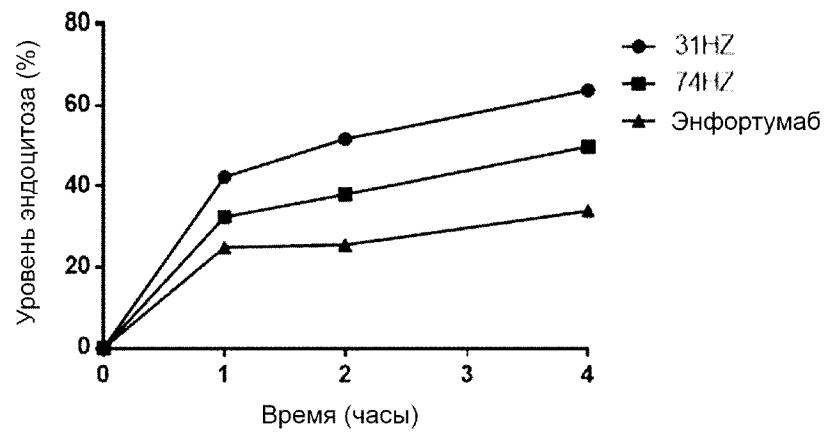
Фиг. 3F



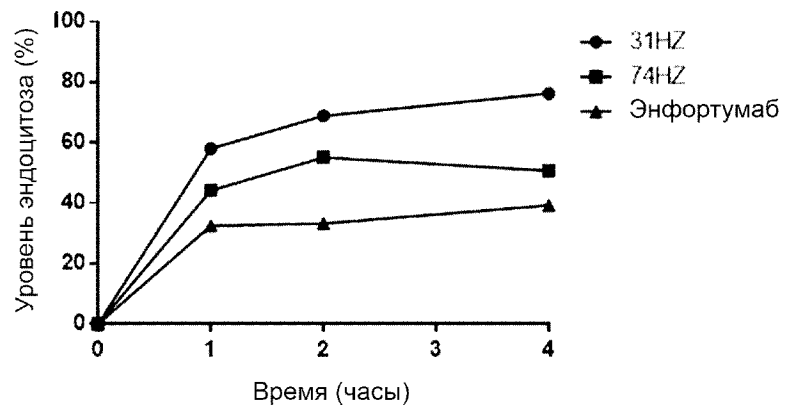
Фиг. 4А



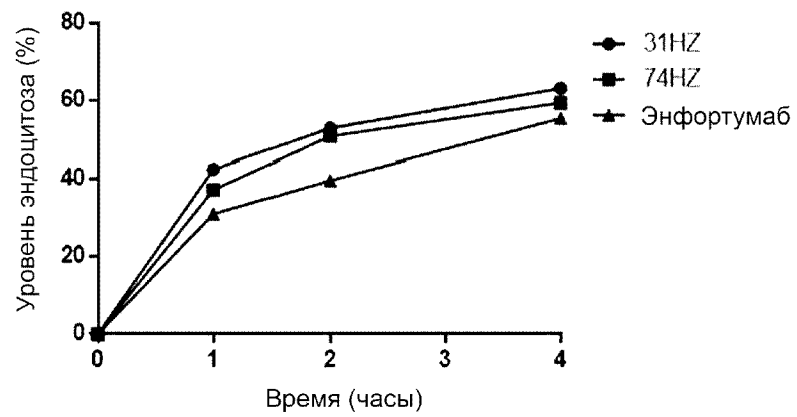
Фиг. 4В



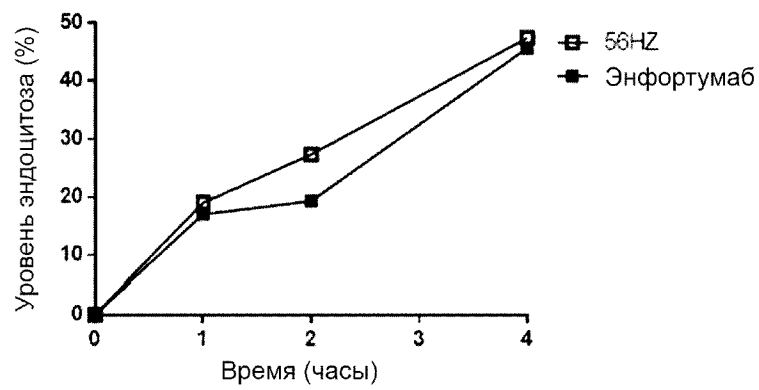
Фиг. 5А



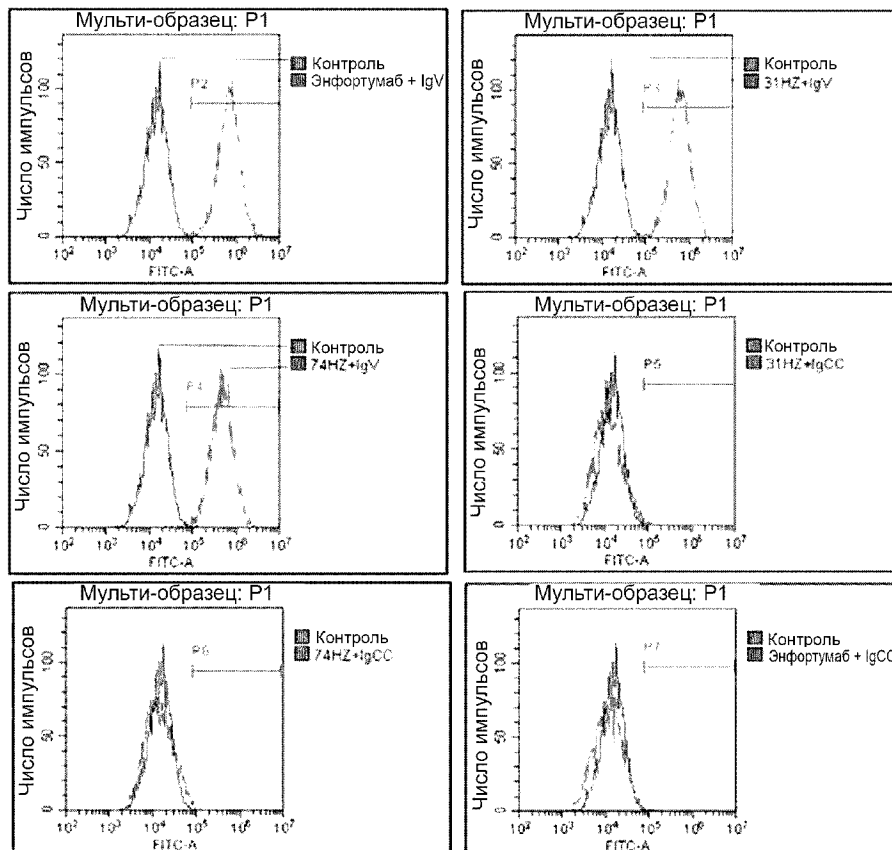
Фиг. 5В



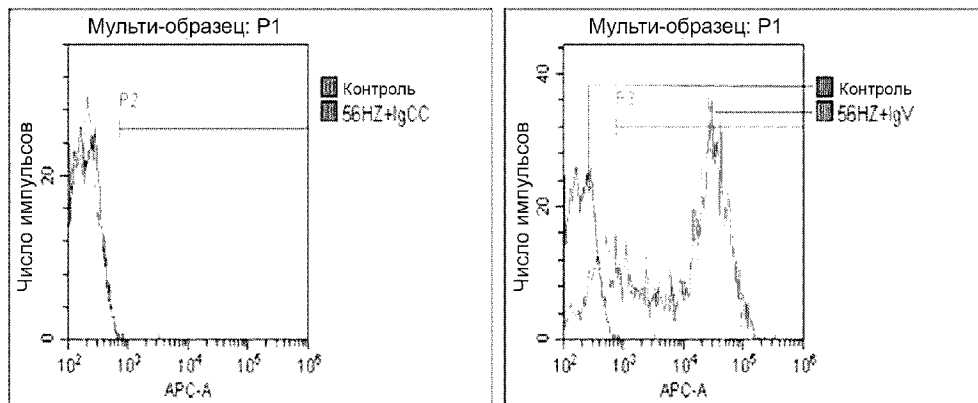
Фиг. 5С



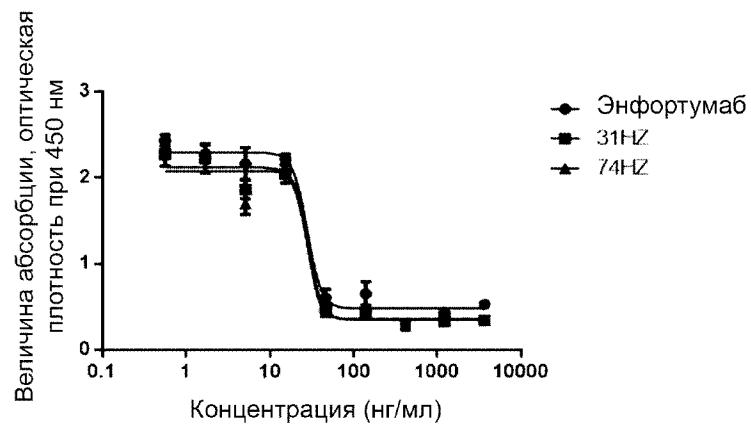
Фиг. 5D



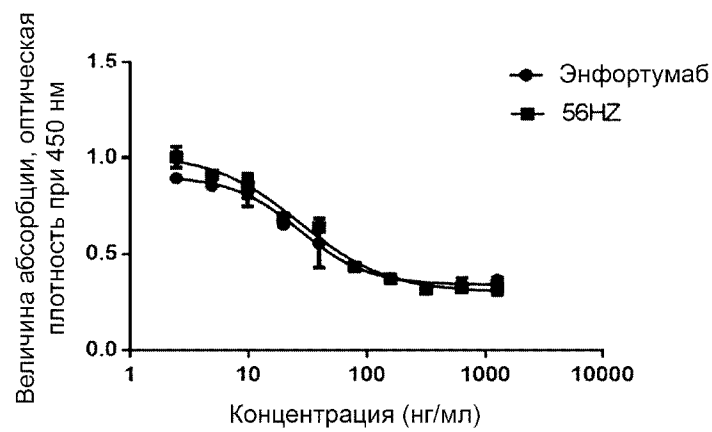
Фиг. 6А



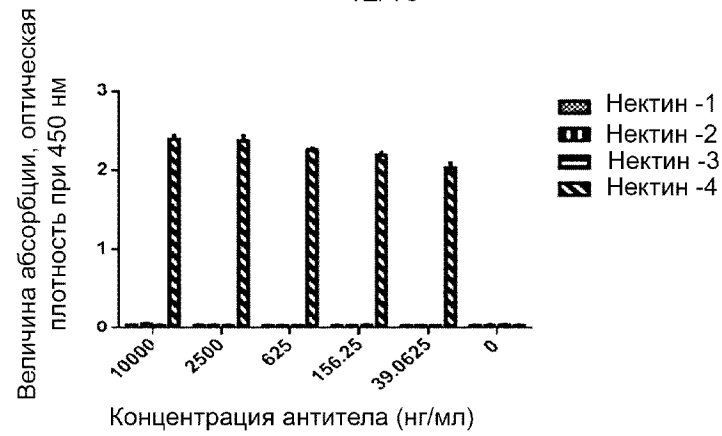
Фиг. 6В



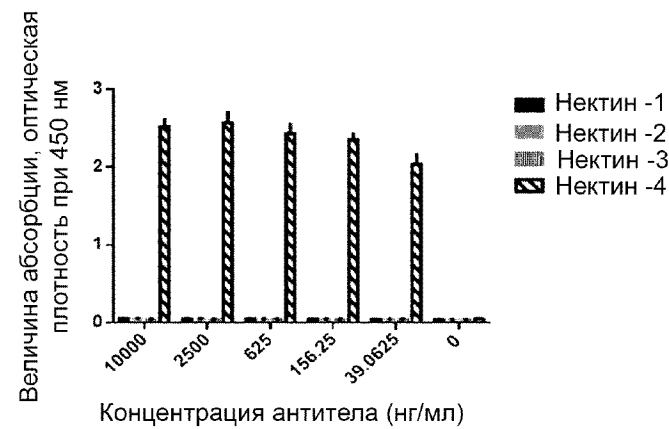
Фиг. 7А



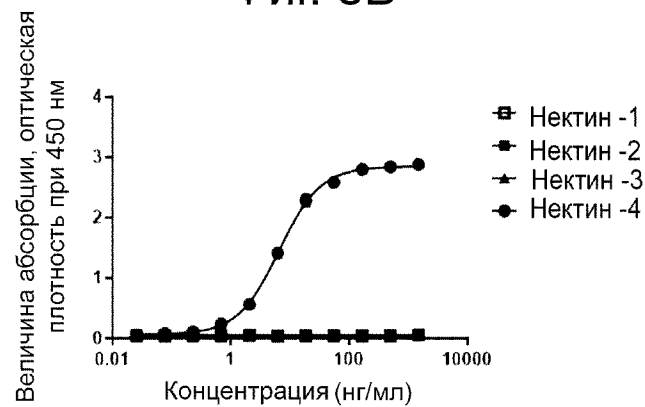
Фиг. 7В



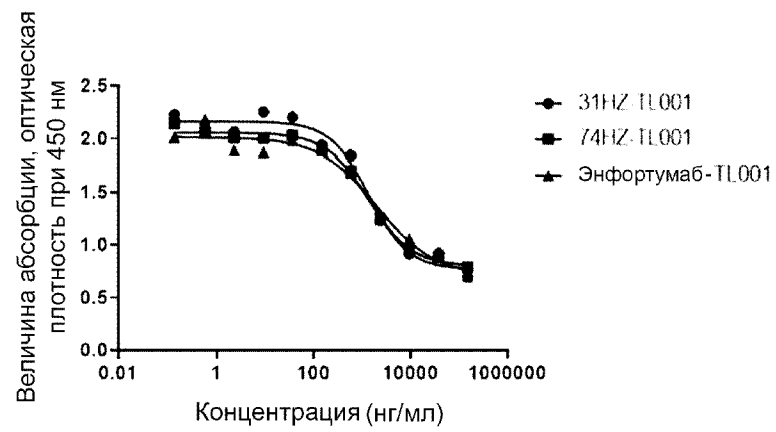
Фиг. 8А



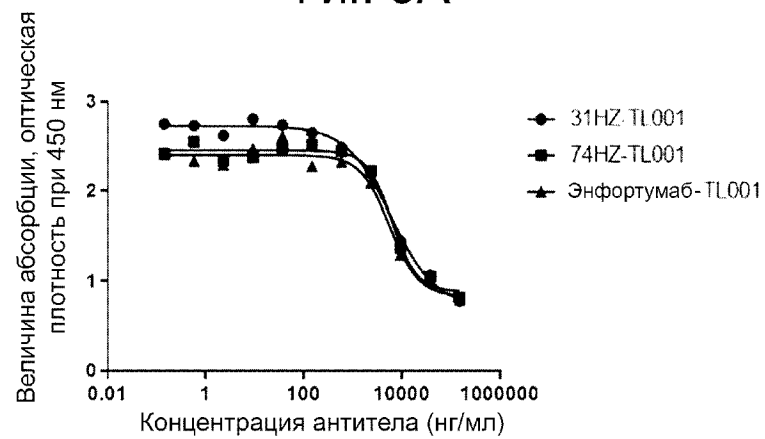
Фиг. 8В



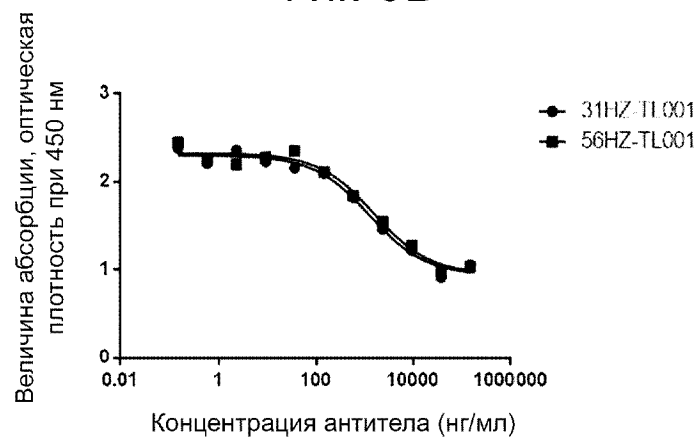
Фиг. 8С



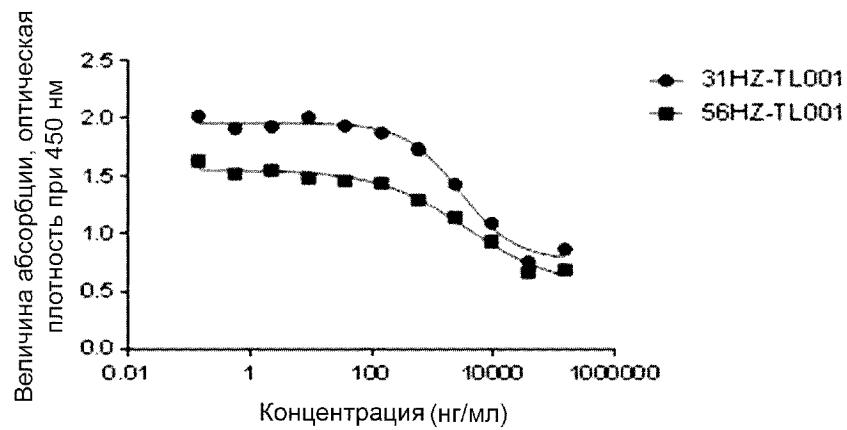
Фиг. 9А



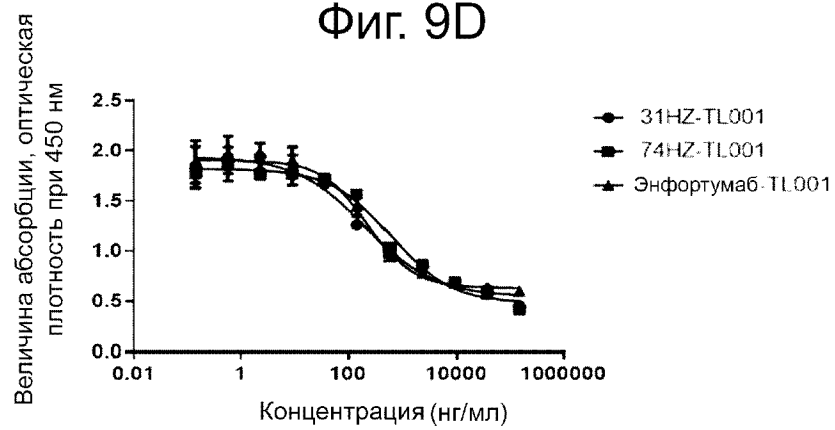
Фиг. 9В



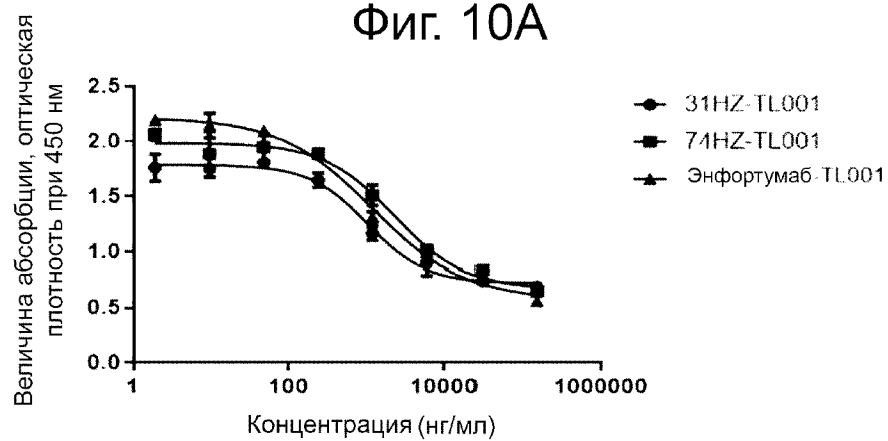
Фиг. 9С



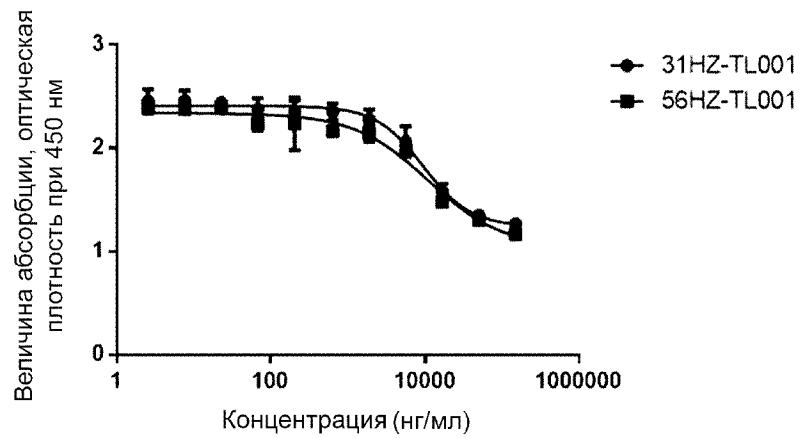
Фиг. 9D



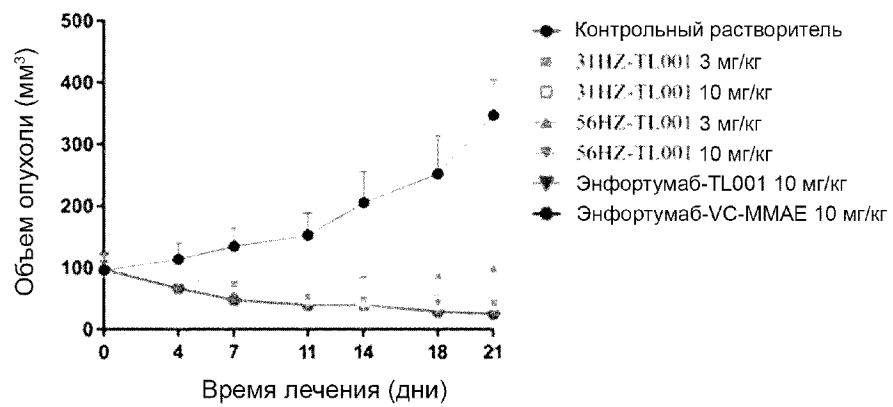
Фиг. 10А



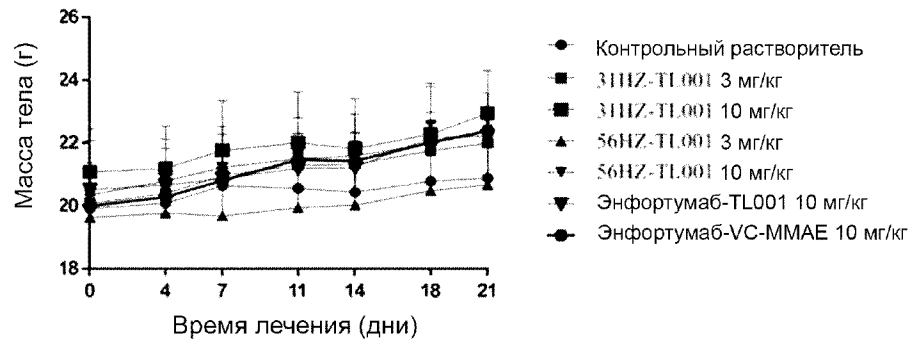
Фиг. 10В



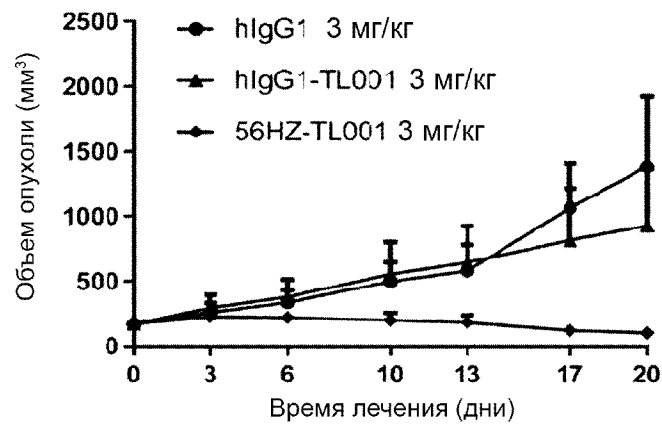
Фиг. 10С



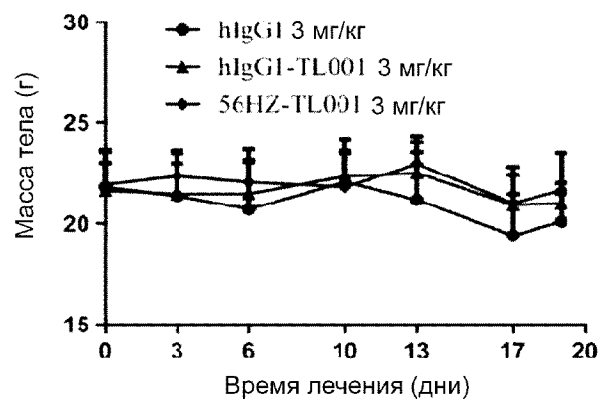
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14