

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392744** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.12.20

(22) Дата подачи заявки
2022.03.31

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 41/00 (2020.01)
A61K 47/50 (2017.01)
A61K 49/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА К НЕКТИНУ-4 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **21166441.2; 21170941.5; 21172723.5;
21209332.2**

(32) **2021.03.31; 2021.04.28; 2021.05.07;
2021.11.19**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/058626**

(87) **WO 2022/207822 2022.10.06**

(71) Заявитель:

**ИМЁРДЖЕНС ТЕРАПЬЮТИКС АГ
(DE); ЮНИВЕРСИТЕ Д'Э-МАРСЕЙ;
ИНСЕРМ (ЭНСТИТИО НАСЪОНАЛЬ
ДЕ ЛЯ САНТЭ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ
МЕДИКАЛЬ); ЭНСТИТИО ЖАН
ПАОЛИ Э ИРЕН КАЛЬМЕТ; САНТР
НАСЪОНАЛЬ ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ
СЪЕНТИФИК - СНРС - (FR)**

(72) Изобретатель:

**Эландс Джэк (BE), Лоспис Флоранс,
Превий Ксавье, Олив Даниель, Лопес
Марк (FR)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, обладающим специфичностью к нектину-4, и к их применению.

A1

202392744

202392744

A1

АНТИТЕЛА К НЕКТИНУ-4 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Предшествующий уровень техники

Настоящее изобретение относится к антителам, обладающим специфичностью к нектину-4, и к их применению.

Нектины - это молекулы адгезии, которые помогают организовать эпителиальные и эндотелиальные контакты и служат в качестве рецепторов для проникновения вируса простого герпеса, вируса кори и полиовируса.

Нектины принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов и являются гомологами рецептора полиовируса (PVR/CD155), и по этой причине их также называют белками, связанными с рецептором полиовируса (PRR). На сегодняшний день было описано 5 членов: PVR/CD155, нектин-1/PRR1/CD111, нектин-2/PRR2/CD112, нектин-3/PRR3 и нектин-4/PRR4(1,10-13). Их эктодомен состоит из трех иммуноглобулиноподобных (Ig) доменов типа V, C, C, которые имеют от 30 до 55% идентичности в своих аминокислотных последовательностях.

Экспрессия молекул нектина/PRR, как правило, широко распространена в тканях, включая гемопоэтические, нейрональные, эндотелиальные и эпителиальные клетки, за исключением нектина-3 и -4, которые демонстрируют более ограниченные профили экспрессии.

Нектин-4 является особенно интересной мишенью. Он экспрессируется во время внутриутробного развития, но его экспрессия снижается и очень ограничена во взрослых тканях по сравнению с другими представителями семейства нектинов. Нектин-4 является опухоль-ассоциированным антигеном в 83% случаев рака мочевого пузыря, 78% случаев рака молочной железы (в основном трижды негативного и ERBB2+), 71% случаев рака поджелудочной железы, 55% случаев рака легких, 57% случаев рака яичников, 59% случаев рака головы и шеи и 55% случаев рака пищевода.

Экспрессия нектина-4 при этих патологиях связана с плохим прогнозом, вероятно, потому, что нектин-4 может придавать опухолевым клеткам *in vitro* более высокие способности к миграции, пролиферации и метастазированию.

В нормальных тканях нектин-4 обнаруживается только в коже, слюнных железах, мочевом пузыре и пищеводе. Недавнее одобрение органами здравоохранения препарата Энфортумаб ведотин для терапии 2-й линии распространенного уротелиального рака завершило валидацию нектина-4 в качестве мишени для лечения рака.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, обладающим специфичностью к нектину-4, их антигенсвязывающим фрагментам, а также к их применению.

В частности, настоящее изобретение обеспечивает гуманизированные антитела, которые получены из моноклонального антитела к нектину-4 15A7.5 мАт.

Авторы изобретения впервые предлагают антитело, т.е. 15A7.5 мАт, а также полученные из него антитела, специфически связывающиеся с нектином-4, экспрессируемым опухолями, с более высокой аффинностью по сравнению с нектином-4, экспрессируемым дифференцированными кератиноцитами человека. *In vitro* эта селективность обеспечивает мАт 15A7.5 с более низкой аффинностью связывания, интернализацией и цитотоксической активностью по отношению к кератиноцитам по сравнению с опухолевыми клетками и по сравнению с активностью мАт НА22 (Энфортумаб) в тех же анализах.

In vivo эта низкая способность связываться с кератиноцитами обеспечивает мАт 15A7.5 более высокий период полужизни из-за более низкой скорости абсорбции в коже.

На мышинной модели ксенотрансплантата лечение установленных опухолей однократным внутривенным введением 4 мг/кг мАт, конъюгированного с эксатеканом, привело к быстрой и длительной регрессии.

Более конкретно, авторы изобретения демонстрируют, что в такой конфигурации 15A7.5 является более эффективным, чем суррогат энфортумаба ведотина, т.е. продукт энфортумаба ведотина, изготовленный с использованием методов, отличных от GMP, третьей стороной, который неотличим от коммерческого энфортумаба ведотина.

Соответственно, антитело 15A7.5 и, в частности, полученные из него гуманизированные варианты, представляют собой новый способ улучшения терапевтического индекса лечения рака нектин-4-позитивного рака, за счет снижения ассоциированной токсичности для кожи и более высокой противоопухолевой селективности и эффективности.

Таким образом, первый аспект изобретения относится к моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с нектином-4, характеризующимся областью VH и при необходимости областью VL, каждая из которых содержит 3 CDR, обозначенных как CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, определяющие специфичность связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела. Предпочтительным является связывание с человеческим нектином-4.

Антитела по изобретению представляют собой моноклональные антитела (мАт) или фрагменты моноклональных антител, характеризующиеся специфической

аминокислотной последовательностью. Если не указано иное, термин «моноклональный» относится к одному виду, т.е. к одному аминокислотному составу антител или фрагментов антител.

Антигенсвязывающий участок антитела по изобретению содержит переменные домены/области тяжелой цепи (VH) и/или переменные домены/области легкой цепи (VL) антитела, или пары VH/VL. Переменные домены/области обозначают каждую из пар легких и тяжелых цепей, которые непосредственно участвуют в связывании антитела с антигеном. Переменный домен тяжелой цепи сокращенно обозначается как «VH», а переменный домен легкой цепи сокращенно обозначается как «VL».

Термин «антигенсвязывающий участок» обозначает область (области) молекулы антитела, с которой лиганд (например, антиген, т.е. нектин-4, или его антигенный фрагмент) фактически связывается, и которая является производной от антитела.

Антигенсвязывающий участок антитела по изобретению может содержать шесть гиперпеременных областей (CDR), которые в различной степени способствуют аффинности участка связывания к антигену. Существует три CDR переменного домена тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) и три CDR переменного домена легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). Также в объем изобретения включены функциональные участки связывания антигена, состоящие из меньшего количества CDR (т.е. там, где специфичность связывания определяется тремя, четырьмя или пятью CDR). Например, для связывания может быть достаточно менее полного набора из 6 CDR. В некоторых случаях будет достаточно домена VH или VL.

Согласно настоящему изобретению, область VH или ее CDR сами по себе могут представлять собой полный антигенсвязывающий участок. В определенных вариантах осуществления антитело содержит область VH или ее CDR, как определено здесь отдельно. В других вариантах осуществления антитело содержит область VH или ее CDR, как определено здесь, вместе с областью VL или ее CDR, в частности, с областью VL или ее CDR, как определено здесь.

Положение CDR в области VH или VL может быть определено в соответствии с системой нумерации Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) или системой нумерации IMGT, обе из которых известны специалистам в данной области техники. Нумерация IMGT была определена для сравнения переменных доменов независимо от рецептора антигена, типа цепи или вида (Lefranc M.-P., "Unique database numbering system for immunogenetic analysis" *Immunology Today*, 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., "The IMGT unique numbering for Immunoglobulins, T cell receptors and Ig-like domains" *The*

Immunologist, 7, 132-136 (1999)).

Другой аспект настоящего изобретения относится к моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с нектином-4, включающему

(а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где

(i) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1 или 7,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или 8,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3 или 9,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

и при необходимости

(б) вариабельную область легкой цепи (VL), в частности область VL, содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

(i) CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4 или 10,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 5 или 11,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 6 или 12,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот.

Конкретные аминокислотные последовательности, представленные SEQ ID NO:, используемые в настоящей заявке, приведены в прилагаемом списке последовательностей.

SEQ ID NO: 1-6 определяют шесть последовательностей CDR родительского антитела по изобретению в соответствии с системой нумерации IMGT. SEQ ID NO: 7-12 определяют шесть последовательностей CDR родительского антитела по изобретению в соответствии с Kabat. Если не указано иное, в настоящей заявке используется система Kabat.

Согласно настоящему изобретению, возможна замена 1 или 2 аминокислот в этих последовательностях CDR. В конкретных вариантах осуществления предпочтительной является консервативная аминокислотная замена, т.е. замена аминокислоты другой аминокислотой с аналогичными биохимическими свойствами, т.е. замена алифатической аминокислоты, например, Gly, Ala, Val, Leu или Ile, на другую алифатическую аминокислоту, основной аминокислоты, например, His, Lys или Arg, на другую основную аминокислоту, кислой аминокислоты или ее амида, например, Asp, Glu, Asn или Gln, на другую кислую аминокислоту или ее амид, ароматической аминокислоты, например, Phe, Trp или Tyr, на другую ароматическую аминокислоту, или гидрокси- или серосодержащей аминокислоты, например, Ser, Thr, Met или Cys, на другую гидрокси- или серосодержащую аминокислоту.

«Антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к молекуле, содержащей часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения указанными, Fv, Fab, Fab-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Термин также охватывает гибридный белок, например, белок, гибридный с неиммуноглобулиновым пептидом или полипептидом, и конъюгат с небелковой структурой, например, меткой или токсином. Термины «антигенсвязывающий фрагмент антитела», «его антигенсвязывающий фрагмент», «фрагмент антитела» или «его фрагмент» могут использоваться в настоящей заявке взаимозаменяемо.

Антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть моно- или поливалентными, т.е. они могут содержать один антигенсвязывающий участок или множество антигенсвязывающих участков. Например, фрагменты Fab имеют один участок связывания с антигеном, антитела класса IgG или фрагменты Fv или scFv имеют два участка связывания с антигеном, а антитела класса IgM имеют 5 участков связывания с антигеном. Термин «антитело» также охватывает гетероспецифические антитела, например, гетеро-биспецифические антитела, которые имеют разные участки связывания с антигеном, в частности антитела, которые направлены к двум разным эпитопам антигена. Используемый в настоящей заявке термин «эпитоп» означает область антигена, которая связана с антителом. Термин «эпитоп» включает любую полипептидную

детерминанту, способную специфически связываться с антителом.

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат в соответствии с системой нумерации IMGT

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 1, CDR-H2 из SEQ ID NO: 2 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 3, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 4, CDR-L2 из SEQ ID NO: 5 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 6.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает, согласно Kabat

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 7, CDR-H2 из SEQ ID NO: 8 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 9, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 10, CDR-L2 из SEQ ID NO: 11 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 12.

Более конкретно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать:

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% по всей длине последовательности,

и при необходимости

(b) область VL, в частности область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% по всей длине последовательности.

«Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» в отношении пептидной или полипептидной последовательности определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процентной идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах компетенции рядового специалиста в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного

обеспечения, такого как BLAST.

Антитело по изобретению может представлять собой химерное антитело, мультиспецифическое антитело, в частности биспецифическое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Согласно настоящему изобретению, «химерное» антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из определенного источника или вида, в то время как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи получена из другого источника или вида.

«Мультиспецифические антитела» связывают два или более различных эпитопа. Эпитопы могут быть на одних и тех же или разных антигенах. Предпочтительным примером мультиспецифического антитела является «биспецифическое антитело», которое связывает два разных эпитопа.

В предпочтительных вариантах осуществления антитело по изобретению представляет собой гуманизированное антитело.

Термин «гуманизированное антитело» или «гуманизированная версия антитела» относится к антителам, для которых как тяжелые, так и легкие цепи гуманизированы в результате инженерии антител. Гуманизированная цепь обычно представляет собой цепь, в которой аминокислотная последовательность V-области была изменена таким образом, что при анализе в целом она ближе по гомологии к последовательности зародышевой линии человека, чем к последовательности зародышевой линии вида, из которого она происходит. Например, мышьяная CDR может быть привита в каркасную область человеческого антитела для получения «гуманизированного антитела». См., например, Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; and Neuberger, M. S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270. Другими формами гуманизированных антител, охватываемыми настоящим изобретением, являются те, в которых константная область была дополнительно модифицирована или изменена по сравнению с таковой у исходного антитела для получения свойств в соответствии с изобретением. Оценка гуманизации основана на полученной аминокислотной последовательности, а не на методологии как таковой.

Другой предпочтительный вариант осуществления относится к человеческим антителам.

Используемый в настоящей заявке термин «человеческое антитело» предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека хорошо известны на современном уровне техники (van Dijk, M. A., and van de

Winkel, J. G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Человеческие антитела также могут быть получены у трансгенных животных (например, мышей), которые после иммунизации способны продуцировать полный набор или избранную часть человеческих антител при отсутствии выработки эндогенного иммуноглобулина.

Антитело по настоящему изобретению может принадлежать к любому подходящему классу. Термин «класс» относится к типу константного домена или константной области, которой обладает его тяжелая цепь. Как используется здесь, «константный домен» или «константная область» обозначает сумму доменов антитела, отличных от переменной области. Константная область непосредственно не участвует в связывании антигена, но проявляет различные эффекторные функции. Антитело может относиться к любому из пяти основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, или к любому их подклассу (изотипу), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Согласно настоящему изобретению, особенно подходящим является антитело класса IgG, IgA или IgM, или его фрагмент.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, антитело по изобретению выбрано из класса IgG, например, подкласса IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, класса IgM, класса IgA или их антигенсвязывающего фрагмента.

В конкретных вариантах осуществления гуманизированные или человеческие антитела по изобретению определяются комбинацией по меньшей мере 3, предпочтительно 6 гиперпеременных областей (CDR), т.е. относятся к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, включающим

(а) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую гиперпеременные области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где

(i) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 21, 35, 49 или 63,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 22, 36, 50 или 64,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 23, 37, 51 или 65,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот, и при необходимости

(b) вариабельную область легкой цепи (VL), в частности область VL, содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

(i) CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 24, 38, 52 или 66,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25, 39, 53 или 67,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 26, 40, 54 или 68,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот.

Специфические гуманизированные или человеческие антитела согласно настоящему изобретению могут включать

(a) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 21, CDR-H2 из SEQ ID NO: 22 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 23,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 24, CDR-L2 из SEQ ID NO: 25 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 26, или

(b) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 38, CDR-L2 из SEQ ID NO: 39 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 40, или

(c) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 50 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 51,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54, или

(d) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68, или

(e) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 21, CDR-H2 из SEQ ID NO: 22 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 23,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 38, CDR-L2 из SEQ ID NO: 39 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 40, или

(f) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 21, CDR-H2 из SEQ ID NO: 22, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 23,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54, или

(g) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 21, CDR-H2 из SEQ ID NO: 22 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 23,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68, или

(h) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 24, CDR-L2 из SEQ ID NO: 25 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 26, или

(j) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54, или

(k) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68, или

(l) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 50 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 51,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 24, CDR-L2 из SEQ ID NO: 25 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 26, или

(m) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 50, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 51,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 38, CDR-L2 из SEQ ID NO: 39 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 40, или

(n) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 50 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 51,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68, или

(o) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 24, CDR-L2 из SEQ ID NO: 25 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 26, или

(p) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 38, CDR-L2 из SEQ ID NO: 39 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 40, или

(q) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54.

В частности, предпочтительными являются гуманизированные антитела (a), (b), (c), (d), (j), (k), (n) и (q), как определено выше.

Конечно, гуманизированные или человеческие антитела по изобретению также могут быть определены по их областям VH и/или VL.

Такие антитела могут включать

(i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27, 41, 55 или 69, или аминокислотную последовательность, имеющую

идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности область VL, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, 42, 56, 70 или 103, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

Специфические гуманизированные или человеческие антитела по изобретению могут быть определены по их областям VH и/или VL, причем такие антитела включают

(a) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 27, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 28, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(b) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 42, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(c) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей

мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(d) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 69, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 70 или 103, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(e) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 27, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 42, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(f) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 27, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(g) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 27, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 70 или 103, или аминокислотную

последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(h) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 28, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(j) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(k) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 70 или 103, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(l) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную

последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 28, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(m) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 42, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(n) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 70 или 103, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

(o) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 69, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 28, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(p) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 69, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 42, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(q) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 69, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

В частности, предпочтительными являются гуманизированные антитела (a), (b), (c), (d), (j), (k), (n) и (q), как определено выше.

Согласно особо предпочтительному варианту осуществления антитела по изобретению и их антигенсвязывающие фрагменты связываются с нектином-4, экспрессируемым опухолями, с более высокой аффинностью по сравнению с нектином-4, экспрессируемым дифференцированными кератиноцитами человека. Такое специфическое связывание обеспечивает, среди прочего, меньшие побочные эффекты, в частности сниженную токсичность для кожи при терапии на основе антител по изобретению.

Используемые в настоящей заявке термины «связывание» и «специфическое связывание» относятся к связыванию антитела по изобретению или его фрагмента с эпитопом антигена нектина-4. Мера силы связывания антитела называется аффинностью. Способы определения такого связывания и/или аффинности с использованием анализов *in vitro* известны специалисту в данной области техники. В соответствии с настоящим изобретением в настоящей заявке описаны и, в частности, являются предпочтительными детекция с помощью проточной цитометрии, иммуногистохимии и/или флуоресценции.

Аффинность связывания антитела с антигеном определяется терминами K_a (константа скорости ассоциации антитела из комплекса антитело/антиген), K_D (константа диссоциации) и K_{dis} (kD/ka).

Антитела согласно изобретению и их антигенсвязывающие фрагменты предпочтительно демонстрируют константу диссоциации K_D , равную по меньшей мере 40, предпочтительно по меньшей мере 45, более предпочтительно по меньшей мере 50 и

наиболее предпочтительно по меньшей мере 55 (нМ).

Особо предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к гуманизированному антителу и его антигенсвязывающим фрагментам, содержащим

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 1, CDR-H2 из SEQ ID NO: 2 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 3, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 4, CDR-L2 из SEQ ID NO: 5 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 6,

где антитело и его антигенсвязывающие фрагменты связываются с нектином-4, экспрессируемым опухолями, с более высокой аффинностью по сравнению с нектином-4, экспрессируемым дифференцированными кератиноцитами человека.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к моноклональным антителам к нектину-4 9A2.7, 3A1.4, а также 8F06 и их антигенсвязывающим фрагментам, как описано в настоящей заявке. Предпочтительными являются гуманизированные варианты этих антител.

Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает моноклональные антитела или их антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с нектином-4, включающие

(a) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где

(i) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 79, 87 или 95,

или аминокислотную последовательность, включающую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 80, 88 или 96,

или аминокислотную последовательность, включающую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 81, 89 или 97,

или аминокислотную последовательность, включающую замену, в частности, консервативную замену 1 или 2 аминокислот, и при необходимости

(b) вариабельную область легкой цепи (VL), в частности область VL, содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

(i) CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 83, 91 или 99,

или аминокислотную последовательность, включающую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 84, 92 или 100,

или аминокислотную последовательность, включающую замену, в частности консервативную замену из 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 85, 93 или 101.

или аминокислотную последовательность, включающую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот.

Один вариант осуществления относится к антителу против нектин-4 или к его антигенсвязывающему фрагменту, включающему

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 79, CDR-H2 из SEQ ID NO: 80 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 81, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 83, CDR-L2 из SEQ ID NO: 84 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 85; или

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 82, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, и при необходимости

(b) область VL, в частности область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 86, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

Антитело 9A2.7 характеризуется такими последовательностями VH-области и VL-области.

Один вариант осуществления относится к антителу против нектин-4 или его антигенсвязывающему фрагменту, включающему

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 87, CDR-H2 из SEQ ID NO: 88 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 89, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 91, CDR-L2 из SEQ ID NO: 92 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 93; или

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 90, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей

мере 99%, и при необходимости

(b) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 94, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

Антитело 3A1.4 характеризуется такими последовательностями VH-области и VL-области.

Один вариант осуществления относится к антителу против нектин-4 или к его антигенсвязывающему фрагменту, включающему

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 95, CDR-H2 из SEQ ID NO: 96 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 97, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 99, CDR-L2 из SEQ ID NO: 100 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 101; или

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 98, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, и при необходимости

(b) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 102, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

Антитело 8F06 характеризуется такими последовательностями VH-области и VL-области.

SEQ ID NO: 79-86 характеризуют мАт 9A2.7.

SEQ ID NO: 87-94 характеризуют мАт 3A1.4.

SEQ ID NO: 95-102 характеризуют мАт 8F06.

Помимо более низкой аффинности связывания, представленные здесь антитела и фрагменты по изобретению также демонстрируют предпочтительно более низкую интернализацию и/или цитотоксическую активность по отношению к кератиноцитам по сравнению с опухолевыми клетками.

Согласно особо предпочтительному варианту осуществления, антитела и фрагменты по изобретению проявляют более низкую аффинность связывания, более низкую интернализацию и более низкую цитотоксическую активность по отношению к кератиноцитам по сравнению с опухолевыми клетками.

Конечно, предпочтительным является специфическое связывание с человеческим

нектином-4, экспрессируемым опухолями. Таким образом, представленные здесь антитела демонстрируют предпочтительно специфическое связывание с нектином-4 и отсутствие существенной перекрестной реактивности с другими белками, в частности с белками семейства нектинов человека, такими как нектин-1.

Согласно дополнительному аспекту, настоящее изобретение также относится к моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, характеризующемуся связыванием с человеческим нектином-4, экспрессируемым опухолями, с более высокой аффинностью по сравнению с нектином-4, экспрессируемым дифференцированными кератиноцитами человека. Для сравнения, аффинность связывания может быть определена с помощью проточной цитометрии, иммуногистохимии и/или флуоресценции.

Согласно дополнительному варианту осуществления, антитела по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты содержат маркирующую группу и/или эффекторную группу, связанную с антителом или антигенсвязывающим фрагментом. Маркирующей группой может быть, например, краситель, парамагнитная, радиоактивная или флуорогенная группа, которая обнаруживается при визуализации. Предпочтительной эффекторной группой является терапевтическая группа, в частности цитотоксический агент, такой как химиотерапевтические активные агенты, лекарственные средства, противовоспалительные агенты, радиоактивные изотопы, токсины, такие как топоизомеразные яды, ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты, средства, ингибирующие рост, антибиотики, а также все подходящие противораковые и противоопухолевые средства, известные специалисту в данной области техники. Особо предпочтительным является топоизомеразный яд камптотецин и его производные и/или структурные аналоги, такие как эксатекан, а также его производные, такие как дерукстекан.

Предпочтительный вариант осуществления противоопухолевого средства относится к противоопухолевым иммуностимулирующим агентам, включая, без ограничения указанными, агонисты toll-подобных рецепторов (TLR) или стимуляторы путей генов интерферона (STING).

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления противовоспалительное средство может быть выбрано из группы, включающей стероиды и кортикостероиды, такие как глюкокортикоиды, например, кортизол и его производные, или минералокортикоиды, такие как альдостерон и его производные.

Согласно дополнительному аспекту изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предназначены для использования в медицине, в

частности, для терапевтических или диагностических применений, включая диагностические применения *in vitro* и *in vivo*.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть использованы в способе профилактики и/или лечения рака и/или воспалительных расстройств, где рак и/или воспалительное расстройство предпочтительно связаны со сверхэкспрессией нектин-4.

Рак, подлежащий профилактике и/или лечению, может быть любым видом рака, причем термин «рак» используется здесь для обозначения пролиферативных заболеваний. Рак, подлежащий профилактике и/или лечению в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно выбран из группы, состоящей из уротелиального рака, рака эндометрия, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака печени, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака легких, рака яичника, рака головы и шеи, и/или рака пищевода.

Обладая высокой специфичностью к нектину-4, экспрессируемому в опухолях, антитела по изобретению и их фрагменты могут также использоваться в диагностике, например, в сочетании с маркирующей группой, как описано выше.

Согласно дополнительному аспекту, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящей заявке, могут быть использованы в способе профилактики и/или лечения воспалительного расстройства, где воспалительное расстройство предпочтительно связано с экспрессией нектин-4. Такое лечение может предпочтительно сочетаться с противовоспалительным средством, известным специалисту в данной области техники. Предпочтительные противовоспалительные средства описаны выше.

Другим аспектом настоящего изобретения является комбинация по меньшей мере из 2 различных моноклональных антител или фрагментов, как описано в настоящей заявке.

Кроме того, настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, например молекуле ДНК, кодирующей область VH антитела, или область VL антитела, или кодирующей полное антитело или фрагмент антитела, как указано выше; к вектору или векторной системе, т.е. множеству векторов, содержащих указанную молекулу (молекулы) нуклеиновой кислоты, как указано выше, предпочтительно в функциональной связи с последовательностью, контролирующей экспрессию, в частности, с гетерологичной последовательностью, контролирующей экспрессию.

Кроме того, изобретение относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, или вектор или векторную систему, как описано выше. Термин «вектор»,

используемый в настоящей заявке, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Согласно предпочтительному варианту осуществления, вектор является вектором экспрессии. «Вектор экспрессии» - это вектор, способный направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Векторы, в частности векторы экспрессии для рекомбинантной продукции антител хорошо известны в данной области техники.

Клетка может быть известной клеткой-хозяином для продукции антител или фрагментов антител, например, прокариотической клеткой, такой как клетка *E. coli*, дрожжевой клеткой, клеткой насекомого или клеткой млекопитающего, например, клеткой СНО или гибридной клеткой.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящей заявке. Как правило, антитело или фрагмент антитела вводят в виде фармацевтической композиции, включающей активный агент и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Примеры подходящих носителей и вспомогательных веществ для получения антител или фрагментов антител включают физиологический раствор и водные буферные растворы, и хорошо известны в данной области техники.

В зависимости от стадии и тяжести расстройства, подлежащего лечению, фармацевтическая композиция может быть введена один или несколько раз при лечении расстройства. Например, ее можно вводить ежедневно, каждый второй день, два раза в неделю или еженедельно в течение подходящего периода времени.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят парентерально, например, путем подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции, или путем инфузии. В дополнительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть введена локально, например, перорально, назально или интратрахеально, например, в виде аэрозоля.

Далее настоящее изобретение более подробно объясняется следующими таблицами, фигурами и примерами.

Описание чертежей

Фигура 1: Ch-15A7.5 распознает человеческий нектин-4. Детекция с помощью проточной цитометрии.

Анализ методом проточной цитометрии MDA-MB231, трансфицированных N-концевым эпитопом нектин-4, меченным Flag, с использованием диапазона доз (0,3 нг/мл

- 5 мкг/мл) антитела Ch-15A7. Родительские клетки MDA-MB231 включены в качестве контроля. Затем клетки окрашивали конъюгатом фикоэритрина с козым антителом к человеческому Fc. Показана нормализованная средняя интенсивность флуоресценции. Вставка: окрашивание родительских клеток MDA-MB231 моноклональными антителами к нектину-1, -2 и -3 (5 мкг/мл). Представлена средняя интенсивность флуоресценции.

Фигура 2: Ch-15A7.5 распознает IgV-подобный домен человеческого нектина-4. Детекция с помощью ELISA.

96-луночные планшеты покрывали, как указано, 5 мкг/мл рекомбинантного гибридного белка Fc и внеклеточного домена нектина-1 (Nec1-VCC), или рекомбинантного гибридного белка Fc и IgV-подобного домена нектина-4 (Nec4-V), или рекомбинантного гибридного белка Fc и внеклеточного домена нектина-4 (Nec4-VCC) в течение ночи при температуре 4°C. Ch15A7.5 распознает внеклеточный домен нектина-4, точнее, IgV-подобный домен нектина-4, но не внеклеточный домен нектина-1.

Фигура 3: Характеристика эпитопа Ch-15A7.5. Конкурентный анализ был проведен методом ELISA.

96-луночные планшеты покрывали 5 мкг/мл рекомбинантного гибридного белка Fc и внеклеточного домена нектина-4 (Nec4-VCC) в течение ночи при температуре 4°C. Связывание конъюгированного с пероксидазой Ch-15A7,5 мАт (5 мкг/мл) измеряли в присутствии увеличивающихся концентраций (2,75 нг/мл - 6 мкг/мл) ритуксимаба, Ch-15A7 мАт, Энфортумаба (HA22), Ch-N41 мАт и Ch-14A5 мАт. HA22, Ch-N41 и CH-14A5 распознают IgV-домен нектина-4.

Фигура 4: Конкуренция мАт Ch-15A7.5 с нектином-1 за связывание с нектином-4. Конкуренцию оценивали с помощью проточной цитометрии.

96-луночные планшеты засевали 50 000 клетками CHO, трансфицированными кДНК человеческого нектина-4. Клетки инкубировали 45 минут с возрастающими концентрациями изотипического контроля или моноклонального антитела Ch-15A7.5 (8 нг/мл – 5 мкг/мл). После промывки планшеты инкубировали с 20 мкг/мл рекомбинантного гибридного белка Fc и внеклеточного домена нектина-1 (Nec1-VCC). Связывание с нектином-1 выявляли после инкубации с козым антителом к человеческому Fc, конъюгированным с фикоэритрином.

Фигура 5: Перекрестная реактивность с нектином-4 от яванской макаки, крысы и мыши. Детекция методом проточной цитометрии.

Анализ методом проточной цитометрии клеток CHO, трансфицированных нектином-4 человека, макаки-крабоеда, крысы или мыши, с использованием диапазона доз антител Ch-15A7 (A), Ch-3A1.4 (B), Ch-9A2.7 (C) или энфортумаба (HA22, D) (0,05

нг/мл – 5 мкг/мл). Затем клетки окрашивали конъюгатом фикоэритрина с козьим антителом к Fc человека. Показана нормализованная средняя интенсивность флуоресценции. В таблицах приведены расчетные значения EC_{50} , определенные программным обеспечением GraphPad Prism 9 с использованием нелинейного построения кривой (4 параметра). Символ «~» указывает на то, что сообщаемое значение является неоднозначным из-за плохой подгонки кривой.

Фигура 6: Дифференциальное связывание с нектином-4, экспрессируемым линией опухолевых клеток, и нормальными дифференцированными кератиноцитами человека. Детекция методом проточной цитометрии.

Анализ клеточной линии TNBC (SUM190, темные символы) и нормальных дифференцированных (0,1 mM CaCl₂) кератиноцитов человека (NHEK, незакрашенные символы) методом проточной цитометрии с использованием диапазона доз (1,2 нг/мл - 5 мкг/мл) энфортумаба (HA22, квадраты), Ch-15A7.5 (круги), Ch-3A1.4 (треугольники) и Ch-9A2.7 (ромбы). Клетки окрашивали конъюгатом фикоэритрина с козьим антителом к человеческому Fc. Показаны нормализованные значения средней интенсивности флуоресценции. Построение нелинейной кривой (4 параметра) было выполнено с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9. Горизонтальная черта расположена на уровне 50% от максимальной интенсивности окрашивания, полученной с помощью антитела HA22 на клетках SUM190.

Фигура 7: Дифференциальное связывание с нектином-4, экспрессируемым линией опухолевых клеток, и нормальными дифференцированными кератиноцитами человека. Детекция методом проточной цитометрии.

Анализ клеточной линии TNBC (SUM190, A) и нормальных дифференцированных (0,1 mM CaCl₂) кератиноцитов человека (NHEK, B) методом проточной цитометрии с использованием 5 мкг/мл HA22 (энфортумаба), Ch-15A7.5 и Ch-8F06. Клетки окрашивали козьим антителом к человеческому Fc, конъюгированным с фикоэритрином. Показаны нормализованные значения средней интенсивности флуоресценции.

Фигура 8: Дифференциальное связывание с нектином-4, экспрессируемым линией опухолевых клеток, и кератиноцитами человека. Детекция с помощью иммуногистохимии.

Криоконсервированные, залитые реагентом OCT блоки с линией опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии нектина-4 (SUM190), линией опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии нектина-4 (SUM149) из кожи человека и яванской макаки обрабатывали для окрашивания 15A7,5 мАт (A) и 9A2,7 мАт (B). Показаны значения по шкале быстрой оценки, полученные для каждого мАт (A, B). C, отношение по шкале

быстрой оценки SUM190 по сравнению с кожей человека.

Фигура 9: Дифференциальная интернализация в линии опухолевых клеток и кератиноцитах человека. Детекция с помощью флуоресценции.

Энфортумаб (HA22), Ch-15A7.5 и изотипические контрольные мАт соединяли с тиолреактивным красителем рНАВ для достижения соотношения краситель-антитело, составляющего от 4,58 до 5,55. Диапазон доз каждого из этих конъюгатов краситель-антитело (1,6 нг/мл - 5 мкг/мл) инкубировали в двух экземплярах с экспрессирующей нектин-4 клеточной линией SUM190PT (A) и нормальными дифференцированными (0,1 mM CaCl₂) человеческими кератиноцитами (B). Внутриклеточную флуоресценцию регистрировали через 24 часа с помощью флуоресцентного ридера микропланшетов (ClarioStar). Приведены данные по интенсивности флуоресценции в зависимости от концентрации конъюгата краситель-антитело.

Фигура 10: Дифференциальная цитотоксическая активность *in vitro* по отношению к опухолевым клеткам и нормальным дифференцированным кератиноцитам человека. Выживаемость клеток измеряли с помощью МТТ-анализа.

Энфортумаб (HA22, ромбы), Ch-15A7.5 (треугольники) и Ch-9A2.7 (квадраты) мАт соединяли с α -аманитином для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство, цитотоксическую активность которых в диапазоне доз (7,7 пг/мл - 15 мкг/мл) оценивали на нектин-4-экспрессирующей клеточной линии SUM190PT (A, D) или нормальных дифференцированных (0,1 mM CaCl₂) человеческих кератиноцитах (B, E). Регистрировали жизнеспособность (МТТ-анализ) после 5-дневного инкубационного периода. Значения EC₅₀ определяли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9 с использованием построения нелинейной кривой (4 параметра). Для каждого состояния рассчитывали и регистрировали отношение EC₅₀ ADC Ch-15A7.5 (C) или ADC Ch-9A2.7 (F) к HA22-ADC. Представленные данные являются типичными для 2 различных линий опухолевых клеток, экспрессирующих нектин-4 (SUM190PT и MDA-MB468), и 3 независимых доноров человеческих кератиноцитов.

Фигура 11: Лечение мышей NSG с трансплантатом SUM190 с помощью ADC Ch-15A7.5-MA-PS- β Glu-эксатекана индуцирует длительный период регрессии опухоли.

У мышей NSG (n=5/группу) проводили ортотопическую двустороннюю ксенотрансплантацию клеток SUM190PT, внедренных в матригель. Были протестированы три различных ADC: изотипический контроль, ICT- и Ch-15A7.5-MA-PS- β Glu-Эксатекан и суррогат энфортумаба ведотина, HA22-MC-vc-PABC-MMAE. Лечение мышей (однократная внутривенная инъекция) начинали, когда опухоли достигали объема приблизительно 150 мм³. Ch-15A7.5-MA-PS- β Glu-Эксатекан (Ch-15A7.5-Ex) оценивали в

2 дозах (4 или 8 мг/кг), ICT-MA-PS- β Glu-эксатекан (ICT-Ex) вводили в дозе 8 мг/кг, а суррогат энфортумаба ведотин (EV) - в дозе 4 мг/кг. Размеры опухоли (n=10/группу) контролировали с помощью штангенциркуля два раза в неделю, и размер определяли по следующей формуле ($L \times l \times h \times \pi / 6$).

Фигура 12: Кажущая аффинность гуманизированных вариантов к опухолевым клеткам. Определение методом проточной цитометрии.

Опухолевые клетки человека T47D, экспрессирующие нектин-4, нумеровали и инкубировали с диапазоном доз (169 пг/мл – 30 мкг/мл) Ch-15A7.5 или указанных гуманизированных вариантов. Числа, ассоциированные с H и L, относятся к числу введенных обратных мутаций. Затем клетки окрашивали конъюгатом фикоэритрина и козьего антитела против человеческого Fc, и анализировали методом проточной цитометрии. Приведены средние значения интенсивности флуоресценции. Для построения нелинейной кривой использовали программное обеспечение GraphPad Prism 9 (4 параметра).

Фигура 13: Лечение мышей NSG с трансплантатом SUM190 с помощью ADC HA22-MA-PS- β Glu-эксатекана индуцирует длительный период регрессии опухоли.

У мышей NSG (n=5/группа) проводили ортотопическую билатеральную ксенотрансплантацию клеток SUM190PT, внедренных в матригель. Были протестированы три различных ADC: изотипический контроль, ICT- и HA22-MA-PS- β Glu-эксатекан и суррогат энфортумаба ведотина, HA22-MC-vc-PABC-MMAE. Лечение мышей (однократное внутривенное введение) начинали, когда опухоли достигали приблизительно 150 мм³. HA22MA-PS- β Glu-эксатекан (HA22-Ex) оценивали в 2 дозах (4 или 8 мг/кг), ICT-MA-PS- β Glu-эксатекан (ICT-Ex) в дозе 8 мг/кг, а суррогат энфортумаба ведотина (EV) в дозе 4 мг/кг. Размеры опухоли (n=10/группу) контролировали с помощью штангенциркуля дважды в неделю, и размеры определяли по следующей формуле ($L \times l \times h \times \pi / 6$).

Фигура 14: Лечение мышей NSG с трансплантатом SUM190 с помощью ADC HA22-MA-PS- β Glu-эксатекан и HA22-MC-GGFG-DX8951 индуцирует длительный период регрессии опухоли.

У мышей NSG (n=5/группу) проводили ортотопическую билатеральную ксенотрансплантацию клеток SUM190PT, внедренных в матригель. Были протестированы пять различных ADC: изотипический контроль, ICT- и HA22 в сочетании либо с MA-PS- β Glu-эксатеканом (ICT-Ex и HA22-Ex), либо с MC-GGFG-DX8951 (ICT- и HA22-Dxd) и суррогатом энфортумаба ведотина, HA22-MC-vc-PABC-MMAE (EV). Лечение мышей (однократная внутривенная инъекция) начинали, когда опухоли достигали

приблизительно 150 мм³. HA22-Eх и HA22-Dхd оценивали в 2 дозах (4 или 8 мг/кг), ICT-EХ и ICT-Dхd вводили в дозе 8 мг/кг, а суррогат энфортумаба ведотина (EV) вводили в дозе 4 мг/кг. Размеры опухоли (n=10/группа) контролировали с помощью штангенциркуля дважды в неделю, и размеры определяли по следующей формуле (LxLxhхPi/6).

Фигура 15: Лечение мышей NOD-Scid с трансплантатом SUM190 с помощью ADC Ch-15A7.5- α -аманитин индуцирует длительный период регрессии опухоли.

Мышам NOD-Scid (n=10/группу) ортотопически вводили ксенотрансплантат клеток SUM190PT, внедренных в матригель. Были протестированы три различных ADC: изотипический контроль, ICT- и Ch-15A7.5- α -аманитин и суррогат энфортумаба ведотина, HA22-МС-vc-РАВС-ММАЕ (суррогат EV). Лечение мышей (2 внутривенные инъекции с интервалом в 7 дней, указано стрелками) начинали, когда объем опухоли достигал приблизительно 120 мм³. Ch-15A7.5- α -аманитин оценивали в 2 дозах (0,5 или 1 мг/кг), ICT- α -аманитин вводили в дозе 1 мг/кг, а суррогат энфортумаба ведотина (EV) вводили в дозе 0,5 или 2 мг/кг. Размеры опухоли (n=10/группу) контролировали с помощью штангенциркуля дважды в неделю, и размеры определяли по следующей формуле (LxLxhхPi/6).

Фигура 16: Лечение мышей NOD-Scid с трансплантатом SUM190 с помощью ADC HA22- α -аманитин индуцирует длительный период регрессии опухоли.

Мышам с NOD-Scid (n=10/группу) ортотопически вводили ксенотрансплантат клеток SUM190PT, внедренных в матригель. Были протестированы три различных ADC: изотипический контроль, ICT- и HA22- α -аманитин и суррогат энфортумаба ведотина, HA22-МС-vc-РАВС-ММАЕ (суррогат EV). Лечение мышей (2 внутривенные инъекции с интервалом в 7 дней, указано стрелками) начинали, когда опухоли достигали приблизительно 120 мм³. HA22- α -аманитин оценивали в 2 дозах (0,5 или 1 мг/кг), ICT- α -аманитин вводили в дозе 1 мг/кг, а суррогат энфортумаба ведотина (EV) вводили в дозе 0,5 или 2 мг/кг. После этого параметры опухоли (n=10/группу) контролировали с помощью штангенциркуля два раза в неделю, и размеры определяли по следующей формуле (LxLxhхPi/6).

Фигура 17: Лечение мышей NOD-Scid с трансплантатом SUM190 с помощью ADC Ch-15A7.5- α -аманитин индуцирует длительный период регрессии опухоли.

Мышам NOD-Scid (n=10/группу) ортотопически вводили ксенотрансплантат клеток SUM190PT, внедренных в матригель. Были протестированы три различных ADC: изотипический контроль, ICT- и Ch-15A7.5- α -аманитин и суррогат энфортумаба ведотина, HA22-МС-vc-РАВС-ММАЕ (суррогат EV). Лечение мышей (1 внутривенная инъекция, указано стрелками) начинали, когда опухоли достигали приблизительно 120 мм³. Ch-

15A7.5- α -аманитин вводили в 3 дозах (2, 4 и 8 мг/кг), ICT- α -аманитин вводили в дозе 8 мг/кг, а суррогат энфортумаба ведотина (EV) вводили в дозе 4 мг/кг. Размеры опухоли (n=10/группа) контролировали с помощью штангенциркуля дважды в неделю, и определяли с помощью следующей формулы ($L \times l \times h \times \pi / 6$).

Фигура 18: Лечение мышей NOD-Scid с трансплантатом SUM190 с помощью ADC HA22- α -аманитин индуцирует длительный период регрессии опухоли.

Мышам NOD-Scid (n=10/группу) ортотопически вводили ксенотрансплантат клеток SUM190PT, внедренных в матригель. Были протестированы три различных ADC: изотипический контроль, ICT- и HA22- α -аманитин и суррогат энфортумаба ведотина, HA22-МС-vc-РАВС-ММАЕ (суррогат EV). Лечение мышей (1 внутривенная инъекция, в область головы) начинали, когда опухоли достигали приблизительно 120 мм³. HA22- α -аманитин вводили в 3 дозах (2, 4 и 8 мг/кг), ICT- α -аманитин вводили в дозе 8 мг/кг, а суррогат энфортумаба ведотина (EV) вводили в дозе 4 мг/кг. Размеры опухоли (n=10/группа) контролировали с помощью штангенциркуля два раза в неделю, и определяли по следующей формуле ($L \times l \times h \times \pi / 6$).

Фигура 19: Дифференциальное связывание Ch-15A7.5 и его гуманизированных вариантов с нектином-4, экспрессируемым линией опухолевых клеток, и нормальными дифференцированными кератиноцитами человека. Детекция методом проточной цитометрии.

Анализ клеточной линии TNBC методом проточной цитометрии (SUM190, верхние панели) и нормальных дифференцированных (0,1 mM CaCl₂) кератиноцитов человека (NHEK, нижние панели) с использованием диапазона доз (8 мкм – 33 нм) Ch-5A12.2, Ch-15A7.5 и его гуманизированных вариантов 15A7.5-H1L2, -H1L3, -H2L2, -H2L3, -H3L0, -H3L2, -H3L3. Клетки окрашивали конъюгатом фикоэритрина с козым антителом к человеческому Fc. Показаны нормализованные значения средней интенсивности флуоресценции. Построение нелинейной кривой (4 параметра) выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9. Отмечен значительно более низкий показатель EC₅₀ Ch-15A7.5 и его гуманизированных вариантов по отношению к кератиноцитам (нижние панели) по сравнению с Ch-5A12.2.

Фигура 20: Аминокислотная последовательность вариабельной тяжелой цепи (VH) и вариабельной легкой цепи (VK) родительского клона антител 5A12.2. Последовательности H-CDR и L-CDR в соответствии с номенклатурой IMTG подчеркнуты.

Фигура 21: Аминокислотные последовательности вариабельных тяжелых цепей (VH) и вариабельных легких цепей (VK) гуманизированных вариантов 9A2.7.

Последовательности H-CDR и L-CDR в соответствии с номенклатурой IMTG подчеркнуты.

Фигура 22: Аминокислотные последовательности переменных тяжелых цепей (VH) и переменных легких цепей (VK) гуманизированных вариантов 3A1.4. Последовательности H-CDR и L-CDR в соответствии с номенклатурой IMTG подчеркнуты.

Фигура 23: Аминокислотные последовательности переменных тяжелых цепей (VH) и переменных легких цепей (VK) гуманизированных вариантов 8F06. Последовательности H-CDR и L-CDR в соответствии с номенклатурой IMTG подчеркнуты.

Фигура 24: Аминокислотные последовательности переменных тяжелых цепей (VH) и переменных легких цепей (VK) родительского клона антител 15A7.5. Последовательности H-CDR и L-CDR в соответствии с номенклатурой IMTG выделены серым фоном.

Фигура 25: Аминокислотные последовательности переменных тяжелых цепей (VH) и переменных легких цепей (VK) гуманизированных вариантов 15A7.5. Последовательности H-CDR и L-CDR в соответствии с номенклатурой IMTG выделены серым фоном.

Фигура 26: Значения аффинности гуманизированных вариантов 15A7.5.

Примеры

Материалы и методы

Клеточные линии:

Клеточную линию карциномы молочной железы человека MDA-MB231 (ATCC, Манассас, Вирджиния) культивировали в DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ глутамин. Клетки были трансфицированы вектором экспрессии p3XFLR4.C1, содержащим кДНК PVRL4. Линию клеток трижды негативного рака молочной железы Human SUM190PT (BioIVT, Уэстбери, Нью-Йорк) культивировали в среде Ham's F12 с 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% неэссенциальных аминокислот, 1% Hepes, 1% инсулина, 1 мкг/мл гидрокортизона, 6,8 нг/мл трийод-L-тирозина, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ глутамин. Клеточную линию CHO яичников китайского хомячка культивировали в DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ глутамин. Клеточные линии рака молочной железы человека MDA-MB-468 и T47D культивировали в RPMI с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл

стрептомицина.

ELISA:

Для контроля специфичности антител к Ch-15A7.5 и для проведения конкурентных анализов между различными мАт использовали сэндвич-иммуоферментный анализ. 96-луночные планшеты покрывали 10 нМ нектин-4-VCC-Fc, нектин-1-VCC-Fc (вся внеклеточная часть) или нектин-4-V-Fc (включающего только IgV-домен) в течение ночи при температуре +4°C. После промывки и насыщения раствором ФБР с 1% БСА, клетки инкубировали в течение 2 часов при 25°C с 10 нМ конъюгированного с пероксидазой Ch-15A7,5 мАт. В случае конкуренции измеряли связывание 0,5 нМ конъюгированного с пероксидазой Ch-15A7,5 мАт в присутствии переменной концентрации (от 0,018 нМ до 40 нМ) простого мАт. Добавляли 100 мкл пероксидазного субстрата (One Step ABST, Pierce), и измеряли оптическую плотность при 405 нм.

Проточная цитометрия:

Клетки или клеточные линии (10000-50000), экспрессирующие нектин-4 (естественным путем или трансфицированные), инкубировали с указанными антителами в диапазоне доз. После промывки клетки окрашивали конъюгированным с фикоэритрином козым антителом против белков человека (5 мкг/мл) (Jackson Immuno Research). После фиксации клетки окрашивали красителем для определения жизнеспособности (e780, Invitrogen) перед проведением проточной цитометрии.

Иммуногистохимия:

Замороженные образцы, хранящиеся при температуре -80°C, держали на сухом льду и помещали в пластиковые криоформы таким образом, чтобы максимально увеличить количество последующих срезов, и помещали в среду для получения срезов при оптимальной температуре (ОСТ). Замороженные блоки ОСТ монтировали на диски с ОСТ и проводили криосекцию при температуре -20°C на криостате NX70 (Thermo Scientific). Криосрезы (7 мкм) помещали на предметных стеклах Superfrost+ (VWR). Готовили только необходимое количество предметных стекол для каждого вида анализа и хранили при температуре -80°C до использования. Оставшиеся блоки хранили при температуре -80°C до дальнейшего использования. Срезы помещали на предметное стекло и фиксировали в ацетоне при температуре -20°C в течение 10 минут. Эндогенные пероксидазы ингибировали путем погружения предметных стекол в перекись водорода (H₂O₂) в рамках протокола Roche DAB kit. Для оптимизации отношения сигнал/шум были протестированы несколько разведений каждого мАт, и 0,5 мкг/мл мышинового 15A7,5 мАт и 10 мкг/мл мышинового 9A2,7 мАт были определены как оптимальные. Чтобы уменьшить неспецифическое связывание вторичного антитела с мышинной тканью, после первичной

инкубации антител добавляли кроличье антитело к IgG мыши (4 мкг/мл, Abscam). Затем использовали конъюгат антител к иммуноглобулинам кролика с пероксидазой хрена Omni-map (Roche) для окрашивания мазков в соответствии с инструкцией производителя (Ventana automat). Была проведена оценка как интенсивности окрашивания, так и доли окрашенных клеток. Два обученных техника наблюдали за одним и тем же полем микроскопа независимо и последовательно. Для каждого поля оценивали как долю окрашенных клеток, так и интенсивность окрашивания. Для каждого окрашивания случайным образом выбирали 10 полей при увеличении, которое обеспечивало наилучшую визуализацию тканей. Процедура подсчета баллов была следующей: (i) оценивали долю клеток, окрашенных положительно, и каждому полю присваивали оценку от 0 до 4 (0= 0-5%; 1= 5-25%; 2= 25-50%; 3= 50-75%; и 4= 75-100%); и (ii) интенсивность окрашивания оценивали как 0, 1, 2 или 3, что соответствовало наличию отрицательного, слабого, промежуточного и сильного коричневого окрашивания, соответственно. Окончательная оценка для каждого поля и для каждого наблюдателя представляла собой результат умножения двух значений (0 = отсутствие окрашивания в ткани; 12 = ткань содержит сильно окрашенные клетки). Для каждого типа ткани на каждом из 5 срезов каждого набора срезов параллельно оценивали 10 независимых полей наблюдения как по интенсивности окрашивания, так и по процентному содержанию меченых клеток. Специалисты одновременно наблюдали за заданным полем (виртуальный слайд на экране компьютера) и оценивали результаты, независимо от результатов других наблюдателей. Для каждого среза были усреднены 10 баллов от каждого специалиста, чтобы установить окончательный балл для каждого наблюдателя. Итоговые оценки двух наблюдателей были усреднены, что дало оценку ткани для данного среза. Для кожи человека представлены только результаты первого набора показателей повторяемости.

Анализ интернализации

Десять тысяч SUM190PT или дифференцированных кератиноцитов человека (0,1 mM CaCl₂) высевали в 96-луночные планшеты и затем инкубировали в течение 24 часов при 37°C с диапазоном доз (1,6 нг/мл – 5 мкг/мл) антител к нектину-4 и изотипического контроля, конъюгированных с тиолреактивным красителем рНАВ. После интернализации и эндолизосомальной обработки кислая среда вызывает флуоресценцию красителя. Интенсивность флуоресценции контролировали на ридере для микропланшетов с возбуждением при 532 нм и излучением при 560 нм.

Цитотоксический анализ in vitro

Для анализа цитотоксической активности ADC in vitro оценивали жизнеспособность клеток с использованием протокола окрашивания AlamarBlue,

рекомендованного производителем (Biosource, Калифорния, США). Тест включает флуоресцентный индикатор окисления-восстановления. Интенсивность флуоресценции пропорциональна снижению клеточного метаболизма. Эксперименты проводили путем инкубации 3000 клеток/лунку (SUM190PT или дифференцированный NHEK) в трех экземплярах с последовательными разведениями ADC на 0-й день в 96-луночных планшетах. AlamarBlue анализировали на 5-й день путем инкубации 1/10 объема раствора alamarBlue в течение 2 часов при 37°C и измерения при 595 нм (FLUOstar Optima, BMG Labtech).

Эксперименты на мышах

Мыши NOD/SCID (не страдающие ожирением диабетиками/тяжелый комбинированный иммунодефицит)/gc null (NSG) были получены от Charles River Laboratory (Маргейт, Великобритания). Самкам в возрасте от шести до семи недель (n=5/группу) была проведена ортотопическая двусторонняя ксенотрансплантация с использованием клеток SUM190PT ($0,5 \times 10^6$), внедренных в матригель. Лечение ADC проводили, как упоминалось в соответствующих экспериментах. Размеры опухоли (n=10/группу) контролировали с помощью штангенциркуля два раза в неделю и определяли по следующей формуле ($L \times l \times h \times \pi / 6$).

Секвенирование гибридомы

Для секвенирования гибридомы сначала выделяли РНК из клеток гибридомы. кДНК генерировали методом обратной транскрипции, а домены VH и VL амплифицировали методом полимеразной цепной реакции с использованием ДНК-полимеразы Prime StarMax (Takara). Продукты ПЦР впоследствии клонировали в специализированный вектор экспрессии тяжелых и легких цепей, а затем секвенировали.

Генерация, продукция, очистка и контроль химерных антител

Вектор экспрессии легкой цепи кодирует V-каппа-цепь. В зависимости от используемой нагрузки использовали 2 различных вектора экспрессии тяжелой цепи, один кодирующий Fc-фрагмент с мутациями D265C (ThiomAb), L234A и L235A, другой кодирующий Fc-фрагмент с мутациями P331S, L234Q и L235F. Оба фрагмента Fc являются «Fc-молчащими». Последовательности анти-нектин-4 Энфортумаба (HA22) также были клонированы в тех же векторах.

Векторы с легкой и тяжелой цепями трансфицировали в НЕК293, посеянные в соотношении 1,2/1. После 6 дней продукции надосадочные жидкости культур осветляли, и мАт очищали с использованием смолы MabSelect Prisma (GE Healthcare) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве связывающего буфера использовали 0,5М глицин, 3М NaCl, pH 8,9, а для элюирования использовали 0,1М цитрат, pH 3.

Постоянную нейтрализацию проводили 10 об.% 1М Трис-НСl с рН 9. Затем моноклональные химерные антитела подвергали диализу против ФБР 1X рН 7,4 (миниприбора для диализа, 2 мл-10к, Thermo Scientific) с последующей фильтрацией на фильтре 0,22 мкм (Milex GV hydrophilic PVDF, Millipore). Концентрацию определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) с учетом удельного коэффициента экстинкции (E1% 280 нм) каждого моноклонального антитела. Чистоту определяли методом эксклюзионной УВЭЖХ с помощью Acquity UPLC-НClass Bio (Waters) с использованием колонки Protein-ВЕН 200А, уравновешенной в 0,2М NaPO₄, 0,3М NaCl, рН 6,9, с добавлением 10% изопропанола. Массу антител определяли на масс-спектрофотометре Xevo G2-S Q-Tof (Waters) с использованием обращенно-фазовой колонки (PLRP-S 4000А, Agilent technologies). Все образцы анализировали после дегликозилирования гликозидазой PNGase F (New England Biolabs) при температуре 37°C в соответствии с инструкциями производителя. Фрагментацию и/или агрегацию конечного материала оценивали с помощью ДСН-ПАГЭ. Концентрацию эндотоксина определяли с помощью хромогенного LAL-кинетического анализа (Charles River Endosafe).

Конъюгация антител

Тиолреактивный краситель рНАВ (Promega) конъюгировали с цистеином отобранных анти-нектин-4 ThiomAb (D265C, L234A, L235A) с использованием малеимидной химии в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, антитела подвергали диализу в 0,1М фосфатном буфере с рН 7,0 перед восстановлением в 2,5 мМ в течение 1 часа при комнатной температуре при слабом перемешивании. Впоследствии DTT удаляли путем двойного промывания/центрифугирования на обессоливающих колонках Zeba spin (7 MWCO). К 100 мкг антитела добавляли 1,2 л реагента рНdye (10 мкг/мл ДМСО) и инкубировали 1 час при комнатной температуре, защищая от света. После удаления избытка красителя с помощью обессоливающих колонок Zeba рассчитывали соотношение краситель-антитело для подтверждения эквивалентной конъюгации между различными антителами.

Цистеин-реактивное соединение линкер-аманитин (Heidelberg Pharma) с расщепляемым линкером (валин-аланин) или с нерасщепляемым линкером конъюгировали с модифицированными цистеиновыми остатками избранных анти-нектин-4 Тио-мАТ (D265C, L234A, L235A) с использованием малеимидной химии. Вкратце, антитела Тио-мАТ в ФБР 1X рН 7,4 были восстановлены с помощью ТСЕР, а дисульфиды межцепочечных соединений были повторно окислены дегидроаскорбиновой кислотой. Впоследствии сконструированные цистеины были использованы для конъюгации с

цистеинреактивным соединением линкер-аманитин HDP 30.1699. Конъюгаты очищали с помощью диализа. Соотношение лекарственного средства и антител (DAR), согласно анализу ЖХ-МС, составляло от 1,44 до 1,79 токсинов на конъюгированное мАт. Как было определено методом эксклюзионной ВЭЖХ, было агрегировано менее 2% материала.

Цистеин-реактивное соединение линкер-эксатекан малеимид-Gly-PSAR10-глюкуронид-эксатекан (MabLink) конъюгировали с цистеиновыми остатками избранных анти-нектин-4 мАт (P331S, L234Q и L235F). Вкратце, мАт в ФБР 1X, 1 мМ ЭДТА восстанавливали 14 молярным эквивалентом ТСЕР в течение 2 часов при 37°C, после чего буфер заменяли (Amicon ultra 30 кДа) на 100 мМ КРО₄, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4. 12 молярных эквивалентов цистеинреактивного соединения линкер-эксатекан использовали для конъюгации с реакционноспособными цистеинами в течение 35 минут при комнатной температуре. Затем буфер заменяли на 100 мМ КРО₄ с рН 8,0 перед инкубацией при 37°C в течение 24 часов при отсутствии кислорода, чтобы малеимид мог самогидролизироваться. Окончательный обмен буфера проводили в 20 мМ растворе с рН 6,0 перед фильтрацией через фильтр 0,22 мкм. Соотношение лекарственного средства и антител (DAR), согласно анализу ЖХ-МС, составляло от 7,77 до 7,82 токсинов на конъюгированное мАт. Как было определено методом эксклюзионной ВЭЖХ, было агрегировано менее 8% материала.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с нектином-4, включающие

(а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где

(i) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1, 7, 79, 87 или 95,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2, 8, 80, 88 или 96,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3, 9, 81, 89 или 97,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот, и при необходимости

(б) вариабельную область легкой цепи (VL), в частности область VL, содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

(i) CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4, 10, 83, 91 или 99,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 5, 11, 84, 92 или 100,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 6, 12, 85, 93 или 101,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот.

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

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 1, CDR-H2 из SEQ ID NO: 2 и CDR-H3 из SEQ ID NO 3, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 4, CDR-L2 из SEQ ID NO: 5 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 6.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, включающие

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 7, CDR-H2 из SEQ ID NO: 8 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 9, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 10, CDR-L2 из SEQ ID NO: 11 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 12.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, включающие

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, и при необходимости

(b) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающие

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 79, CDR-H2 из SEQ ID NO: 80 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 81, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 83, CDR-L2 из SEQ ID NO: 84 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 85.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающие

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 87, CDR-H2 из SEQ ID NO: 88 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 89, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 91, CDR-L2 из SEQ ID NO: 92 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 93.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающие

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 95, CDR-H2 из SEQ ID NO: 96 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 97, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 99, CDR-L2 из SEQ ID NO: 100 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 101.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1 или 5, включающие

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 82, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с

ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, и при необходимости

(b) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 86 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1 или 6, включающие

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 90, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, и при необходимости

(b) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 94 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1 или 7, включающие

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 98, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, и при необходимости

(b) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 102 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, которые представляют собой химерное антитело, мультиспецифическое антитело, в частности биспецифическое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, которые представляют собой антитело класса IgG, например, подкласса IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, класса IgM, класса IgA, или его антигенсвязывающий фрагмент, или которые представляют собой одноцепочечное антитело, или фрагмент Fv антитела.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, 11 или 12,

включающие

(а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где

(i) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 21, 35, 49 или 63,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 22, 36, 50 или 64,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 23, 37, 51 или 65,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот, и при необходимости

(б) вариабельную область легкой цепи (VL), в частности область VL, содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

(i) CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 24, 38, 52 или 66,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 25, 39, 53 или 67,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 26, 40, 54 или 68,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену, в частности консервативную замену 1 или 2 аминокислот.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, 11, 12 или 13, включающие

(а) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 21, CDR-H2 из SEQ ID NO: 22 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 23, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 24, CDR-L2 из SEQ ID NO: 25 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 26, или

(b) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 38, CDR-L2 из SEQ ID NO: 39 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 40, или

(c) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 50 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 51, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53, и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54, или

(d) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68,

(e) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54,

(f) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68, или

(g) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 41 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 42, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68,

(h) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4 и 11-14, включающие

(i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27, 41, 55 или 69, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%; и при необходимости

(ii) область VL, в частности область VL, содержащую аминокислотную

последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, 42, 56, или 70, или 103, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4 и 11-15, включающие

(a) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 27, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%; и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 28, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(b) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 42, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(c) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(d) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 69, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%; и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 70 или 103, или аминокислотную

последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(e) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(f) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 41, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 70 или 103, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(g) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 70 или 103, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(h) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 69, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, которые

связываются с нектином-4, экспрессируемым опухолями, с более высокой аффинностью по сравнению с нектином-4, экспрессируемым дифференцированными кератиноцитами человека.

18. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.17, где аффинность связывания определяют с помощью проточной цитометрии, иммуногистохимии и/или флуоресценции.

19. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с нектином-4, экспрессируемым опухолями, с более высокой аффинностью по сравнению с нектином-4, экспрессируемым дифференцированными кератиноцитами человека.

20. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.20, где аффинность связывания определяют с помощью проточной цитометрии, иммуногистохимии и/или флуоресценции.

21. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-20, содержащие маркирующую группу и/или эффекторную группу, соединенную с антителом или антигенсвязывающим фрагментом.

22. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.21, где маркирующая группа представляет собой краситель, парамагнитную, радиоактивную или флуорогенную группу, которая обнаруживается при визуализации.

23. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.21, где эффекторная группа представляет собой терапевтическую группу, в частности цитотоксический агент.

24. Антитело или фрагмент по любому из пп.1-23 для использования в медицине, в частности для терапевтических или диагностических применений, включая диагностические применения *in vitro* и *in vivo*.

25. Антитело или фрагмент по любому из пп.1-23 для применения по п.18 в способе профилактики и/или лечения рака и/или воспалительных заболеваний.

26. Антитело или фрагмент по любому из пп.1-23 для применения по пп.24 или 25, где рак связан со сверхэкспрессией нектина-4.

27. Антитело или фрагмент по любому из пп.1-23 для применения по любому из пп.24-26, где раком является уротелиальный рак, рак эндометрия, шейки матки, толстой кишки, печени, щитовидной железы, молочной железы, поджелудочной железы, легких, яичников, головы и шеи, и/или пищевода.

28. Комбинация по меньшей мере из 2 различных моноклональных антител или фрагментов по любому из пп.1-23.

29. Нуклеиновая кислота, кодирующая одно или несколько антител по любому из

пп.1-23, или по меньшей мере одну VL и/или одну VH любого из антител по пп.1-23.

30. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.29.

31. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.30.

32. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-27.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ, ИЗМЕНЕННАЯ ПО СТ.34 РСТ

1. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с нектином-4, включающие

(a) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где

(i) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 7,

(ii) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 8,

(iii) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 9,

и

(b) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

(i) CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 10,

(ii) CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 11,

(iii) CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 12.

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

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, и

(b) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1 и 2, которые представляют собой химерное антитело, мультиспецифическое антитело, в частности биспецифическое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, которые представляют собой антитело класса IgG, например, подкласса IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, класса IgM, класса IgA, или его антигенсвязывающий фрагмент, или которые представляют собой одноцепочечное антитело, или фрагмент Fv антитела.

5. Человеческое или гуманизированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с нектином-4, включающие

(a) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 27, и

(ii) область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 28, или

(b) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 41, и

(ii) область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 42, или

(c) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55, и

(ii) область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, или

(d) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 69, и

(ii) область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 70 или 103, или

(e) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 41, и

(ii) область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, или

(f) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 41, и

(ii) область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 70 или 103, или

(g) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55, и

(ii) область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 70 или 103, или

(h) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в

соответствии с SEQ ID NO: 69, и

(ii) область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, содержащие маркирующую группу и/или цитотоксический агент, связанный с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, причем цитотоксическим агентом является камптотecin или его производное.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.6, где маркирующая группа представляет собой краситель, парамагнитную, радиоактивную или флуорогенную группу, которая обнаруживается при визуализации.

8. Антитело или фрагмент по любому из пп.1-7 для использования в медицине, в частности для терапевтических или диагностических применений, включая диагностические применения *in vitro* и *in vivo*.

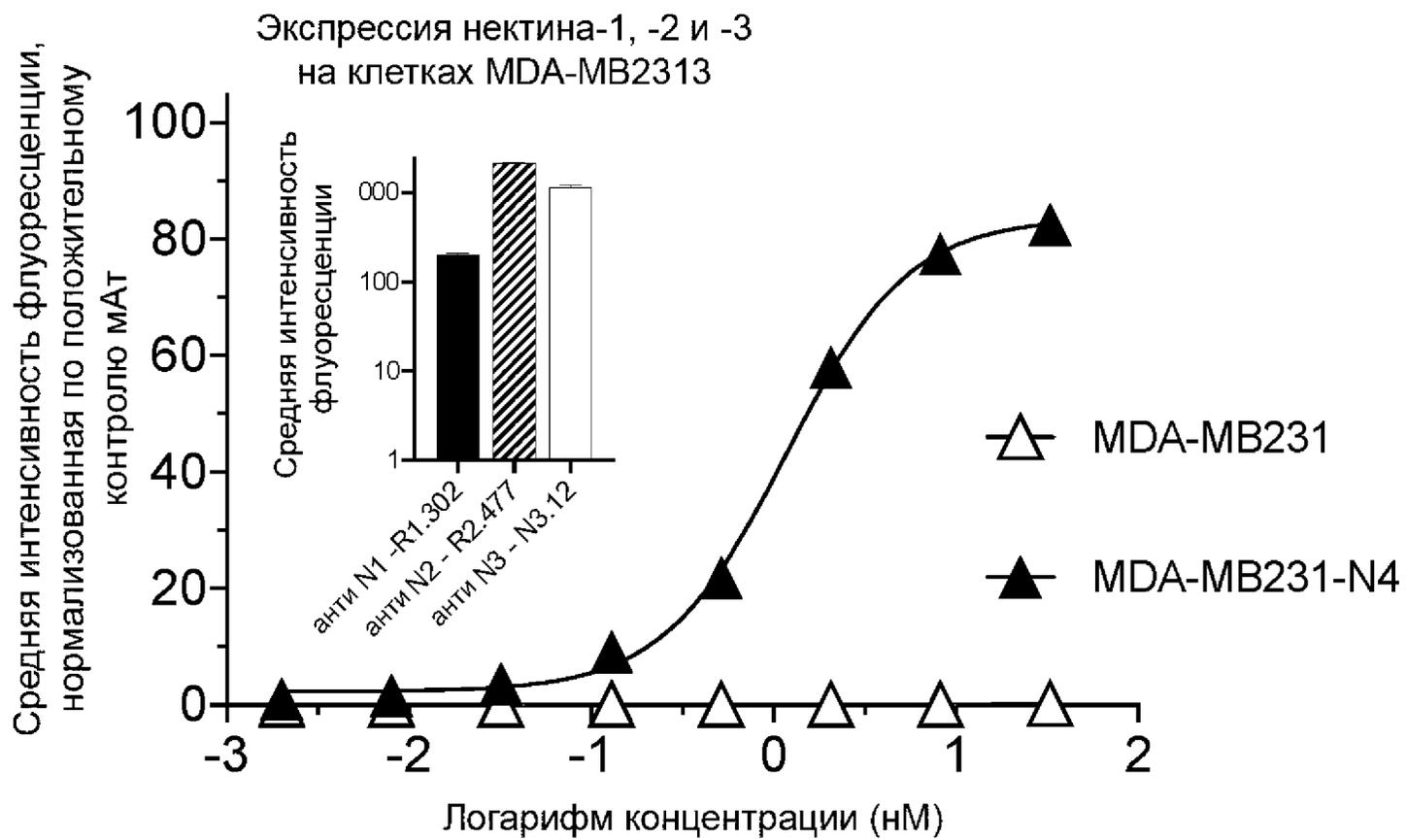
9. Антитело или фрагмент по любому из пп.1-7 для применения по п.8 в способе профилактики и/или лечения рака.

10. Нуклеиновая кислота, кодирующая одно или несколько антител по любому из пп.1-7, или по меньшей мере одну VL и/или одну VH любого из антител по пп.1-7.

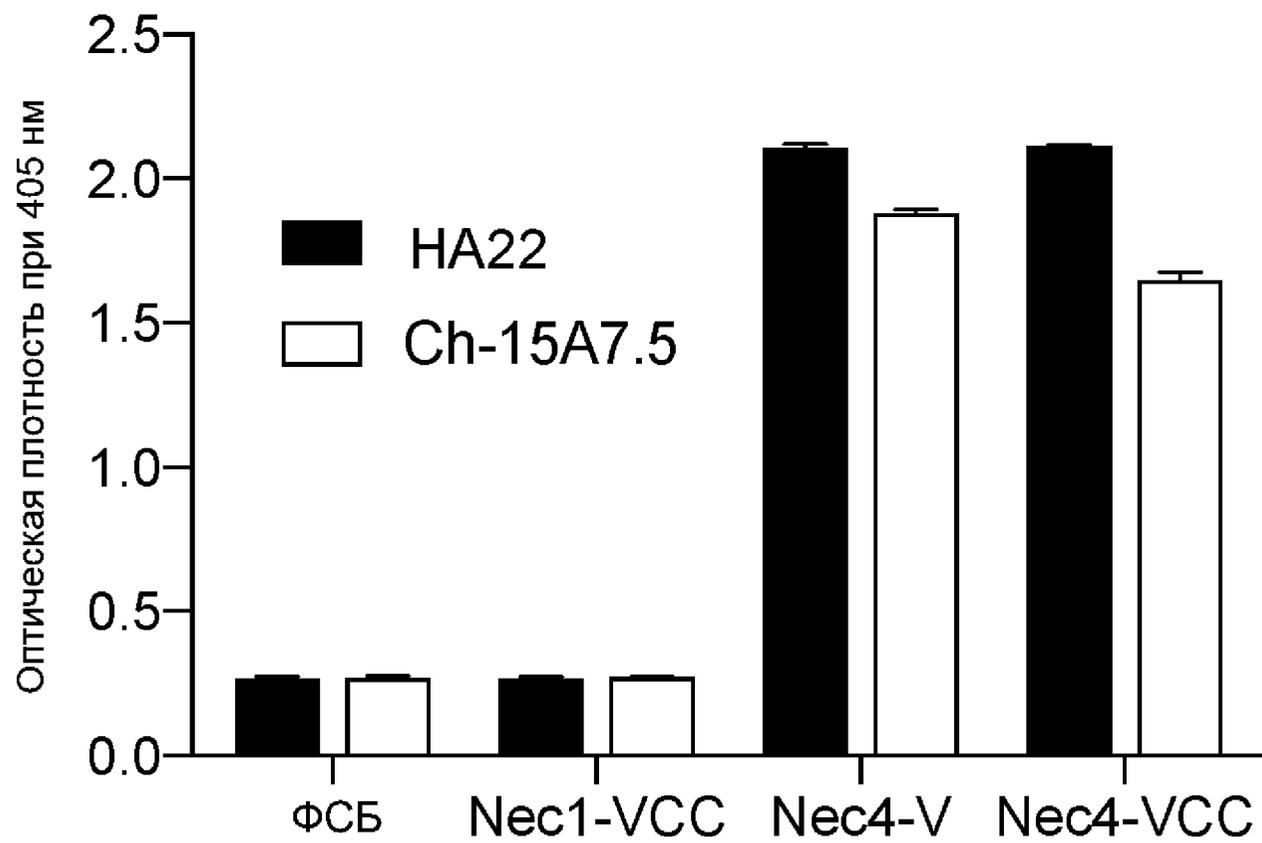
11. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.10.

12. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.11.

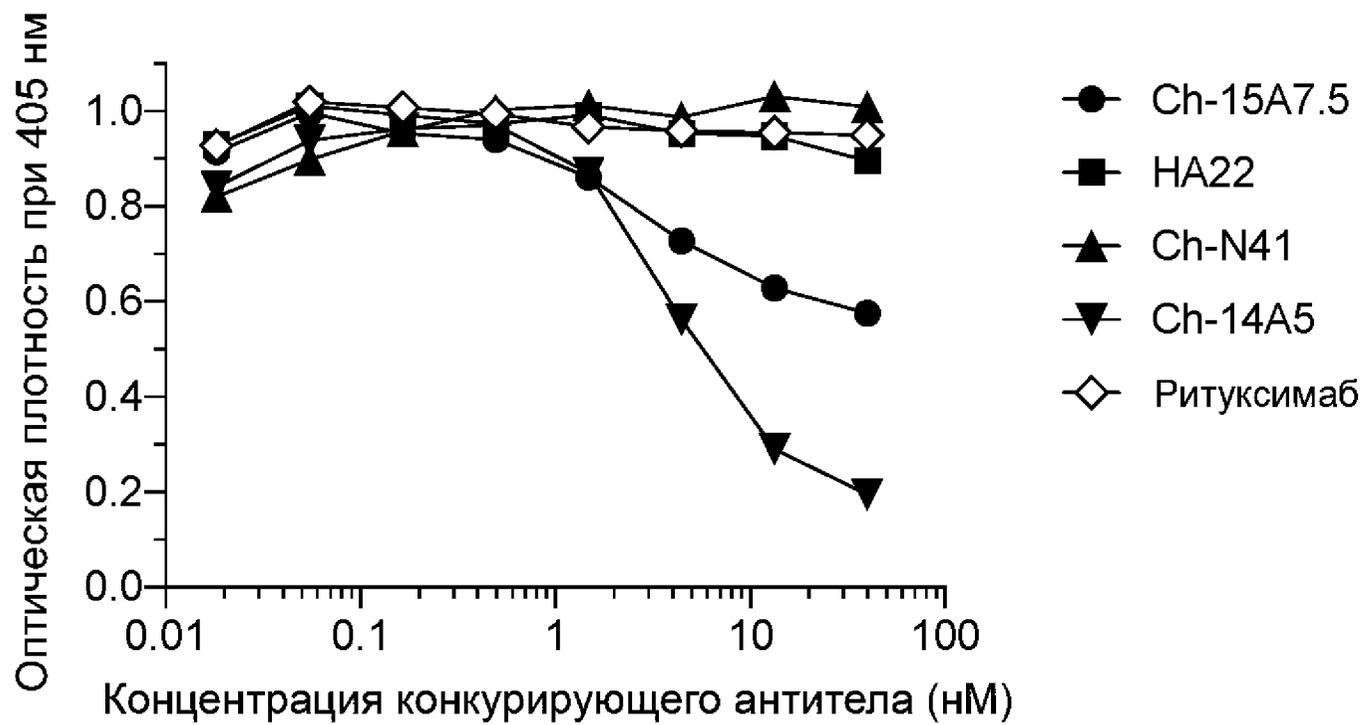
13. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7.



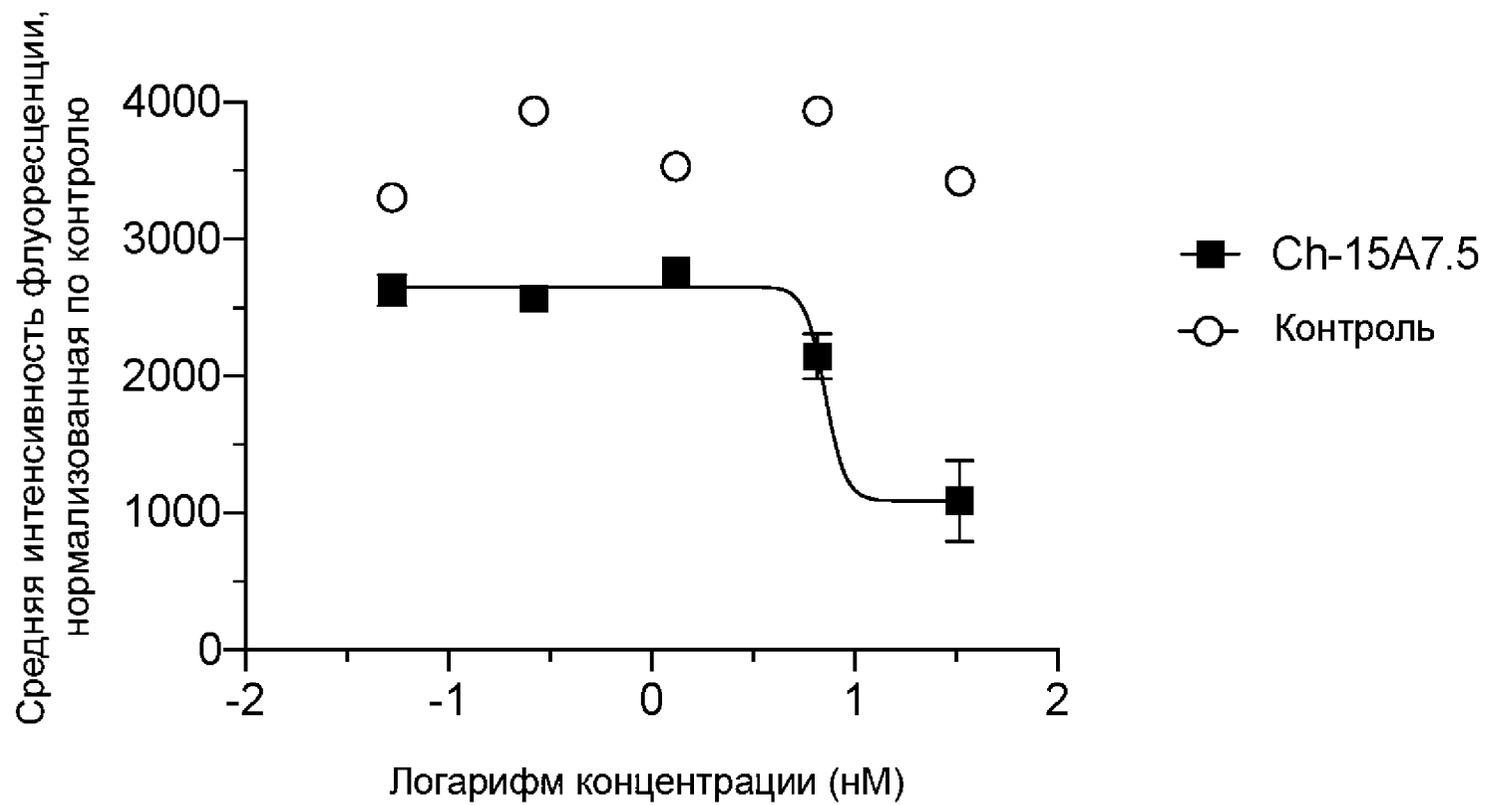
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

A



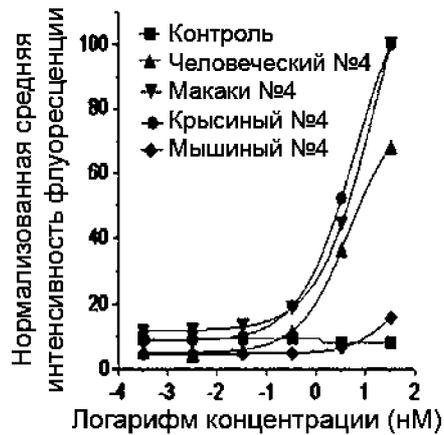
	Контроль	Человеческий №4	Макаки №4	Крысиный №4	Мышиный №4
EC50	~14290	0.6918	1.218	~5.156	~31.17

B



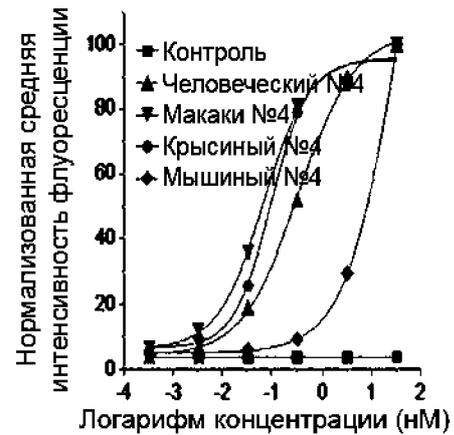
	Контроль	Человеческий	Макаки	Крысиный
EC50	~14290	2.835	8.050	3.013

C



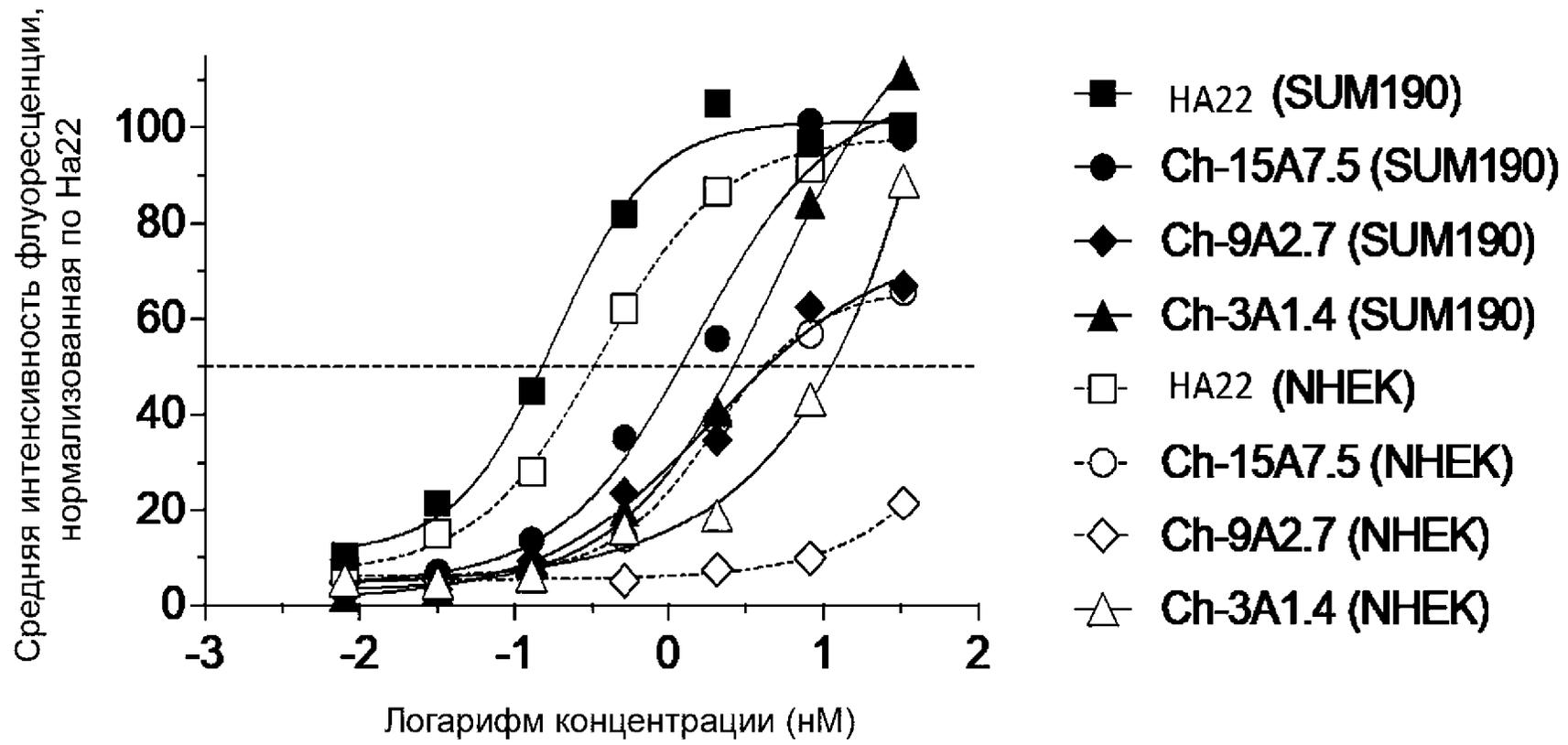
	Контроль	Человеческий №4	Макаки №4	Крысиный №4	Мышиный №4
EC50	~1.239	4.758	16.11	8.415	37.22

D

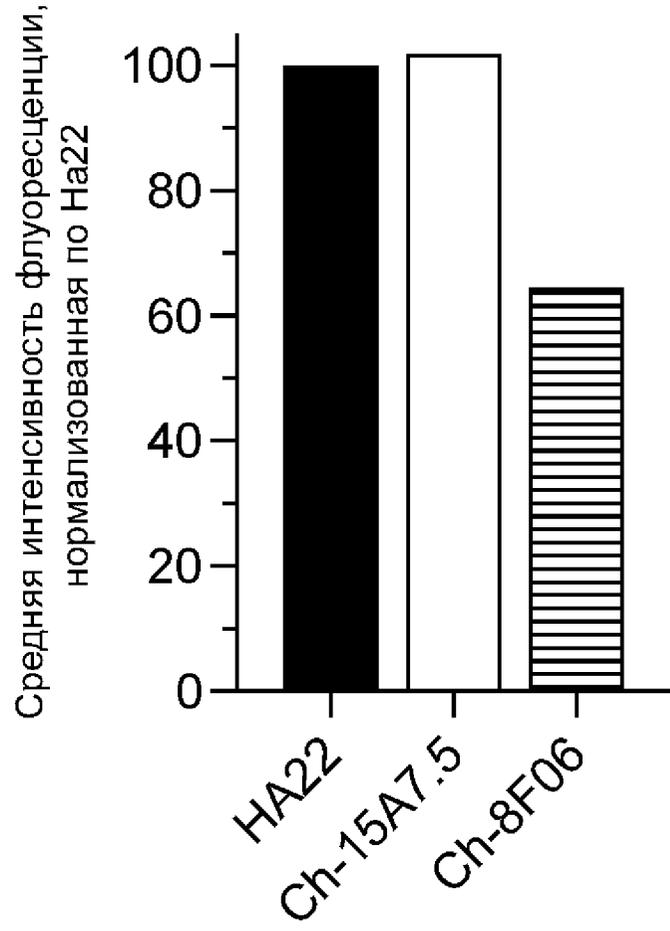
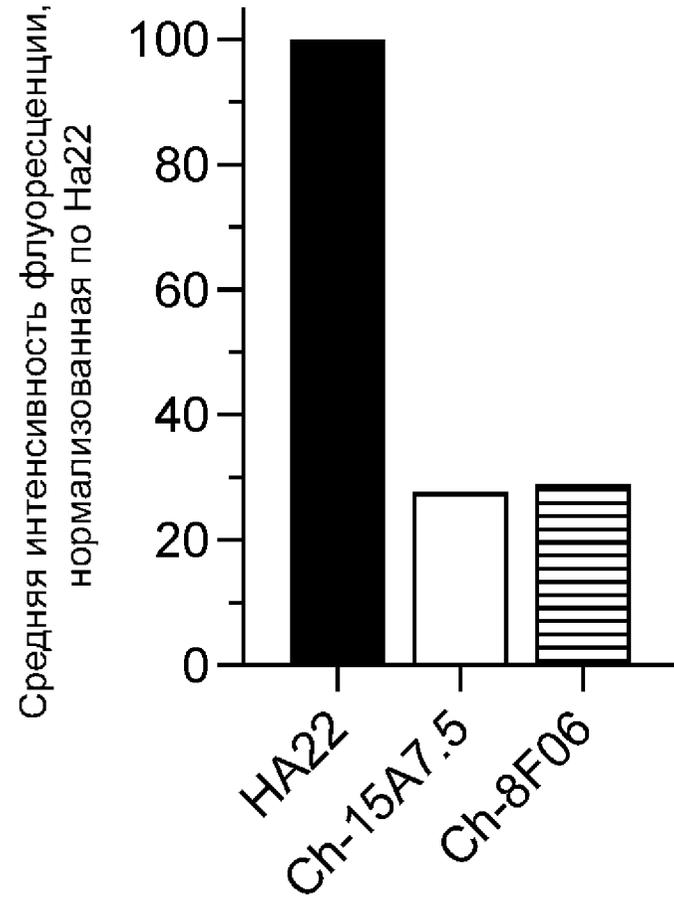


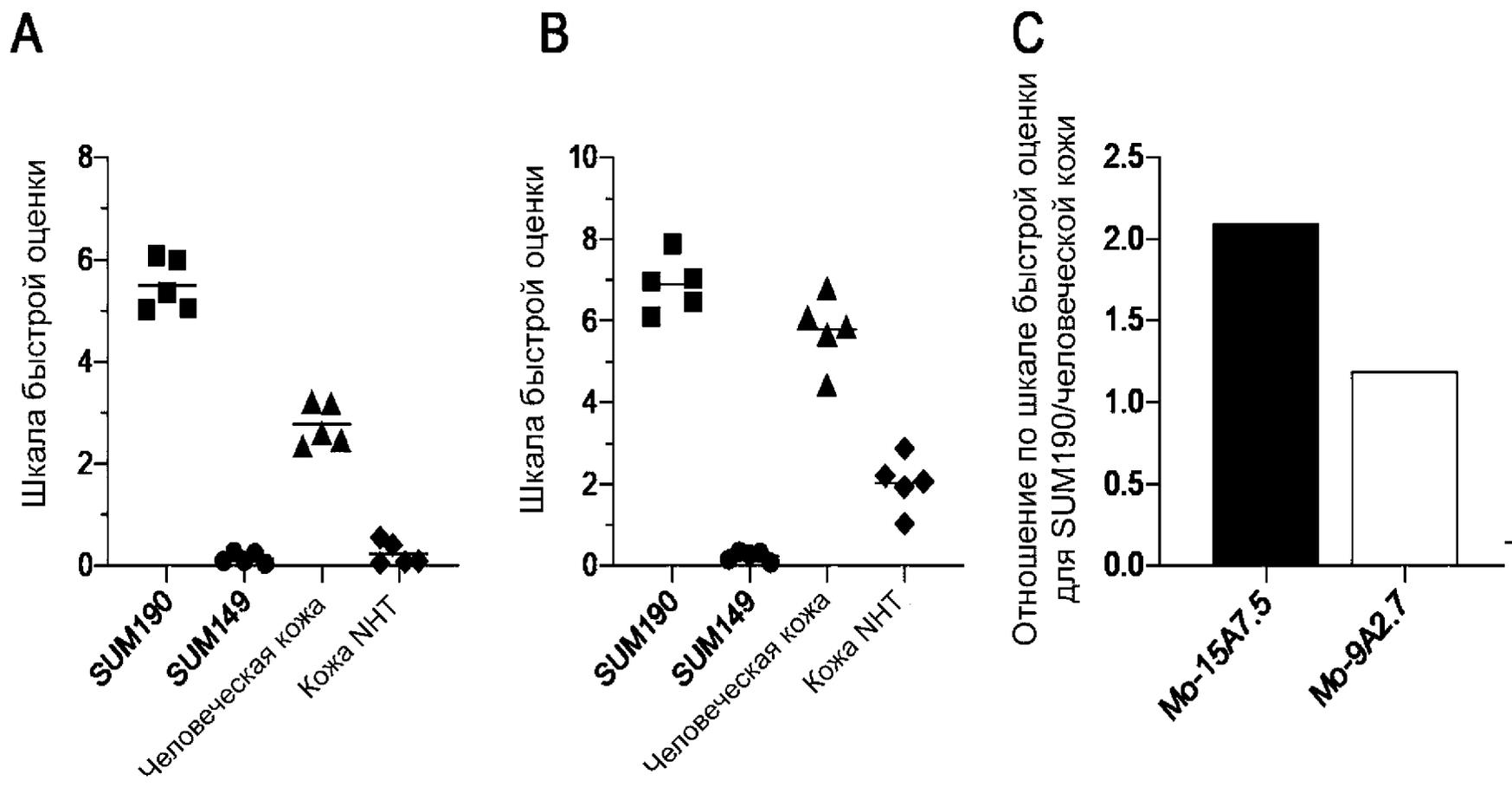
	Контроль	Человеческий №4	Макаки №4	Крысиный №4	Мышиный №4
EC50	~2.662e-022	0.3456	0.06780	0.09696	41.09

Фиг. 5

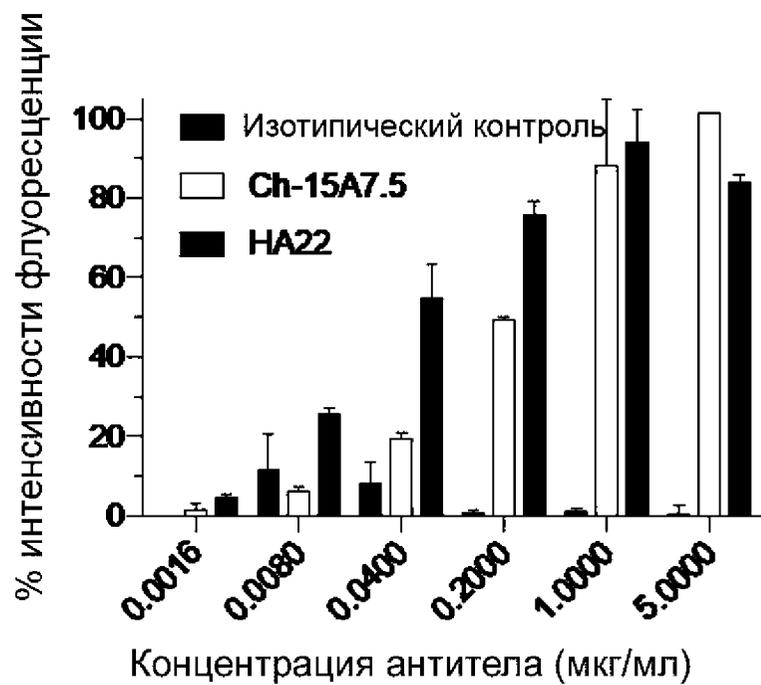
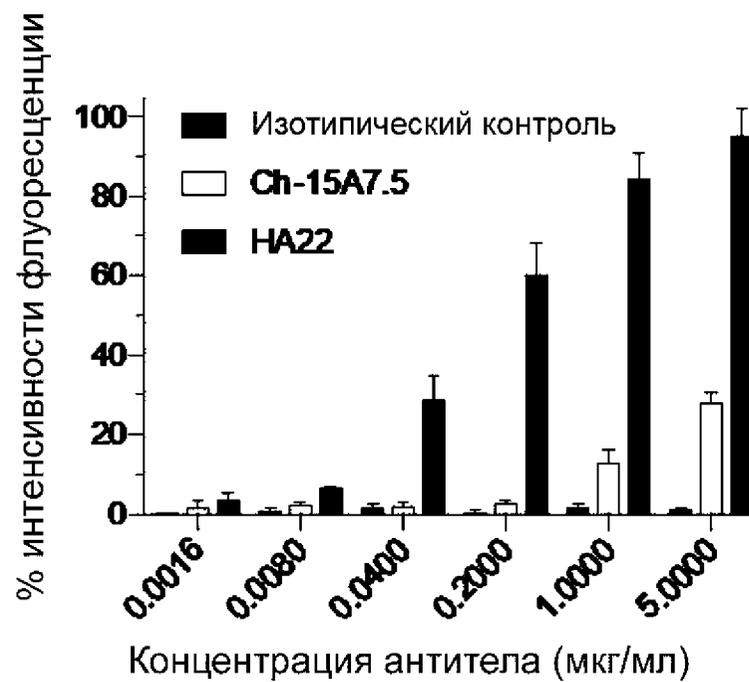


Фиг. 6

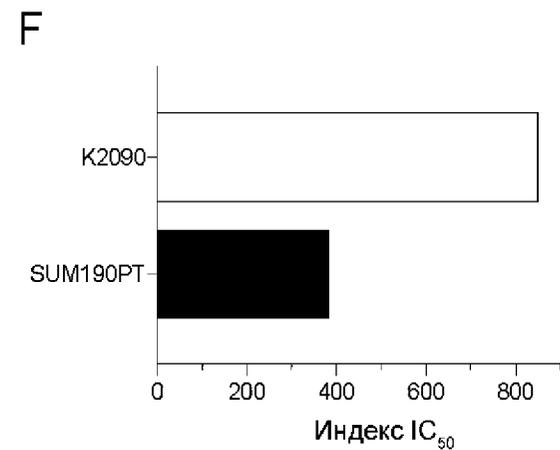
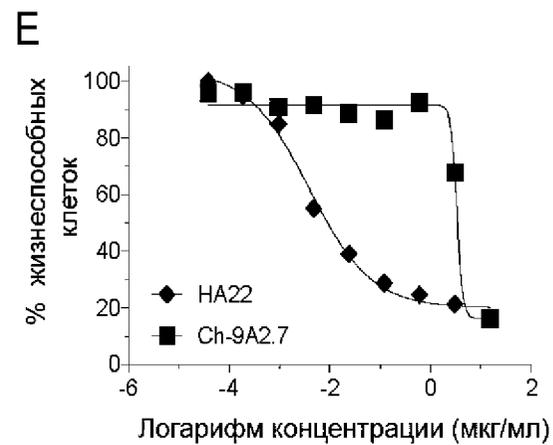
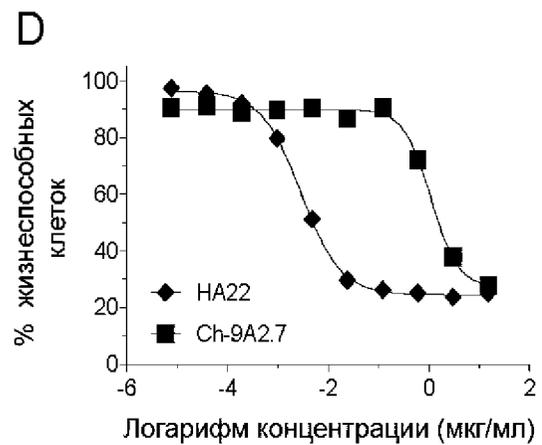
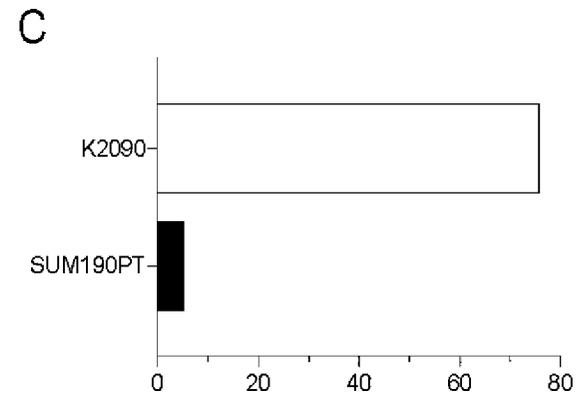
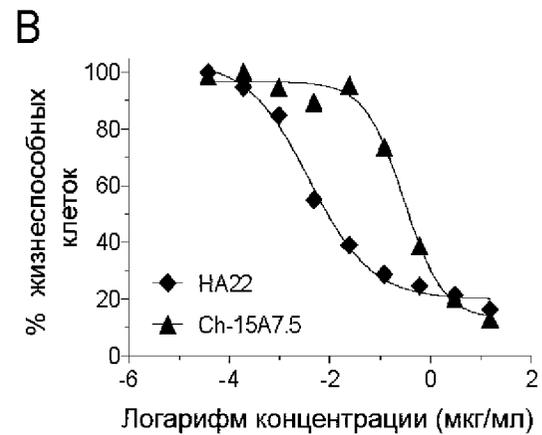
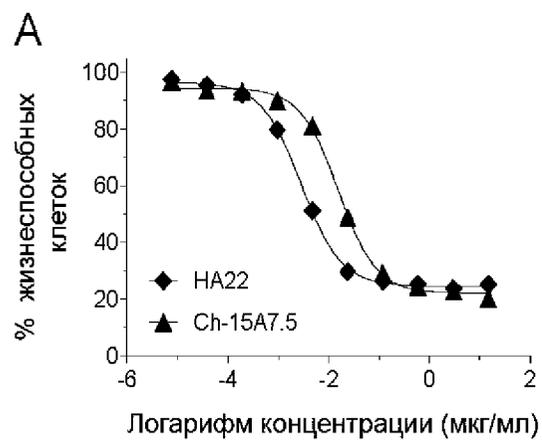
A**B****Фиг. 7**



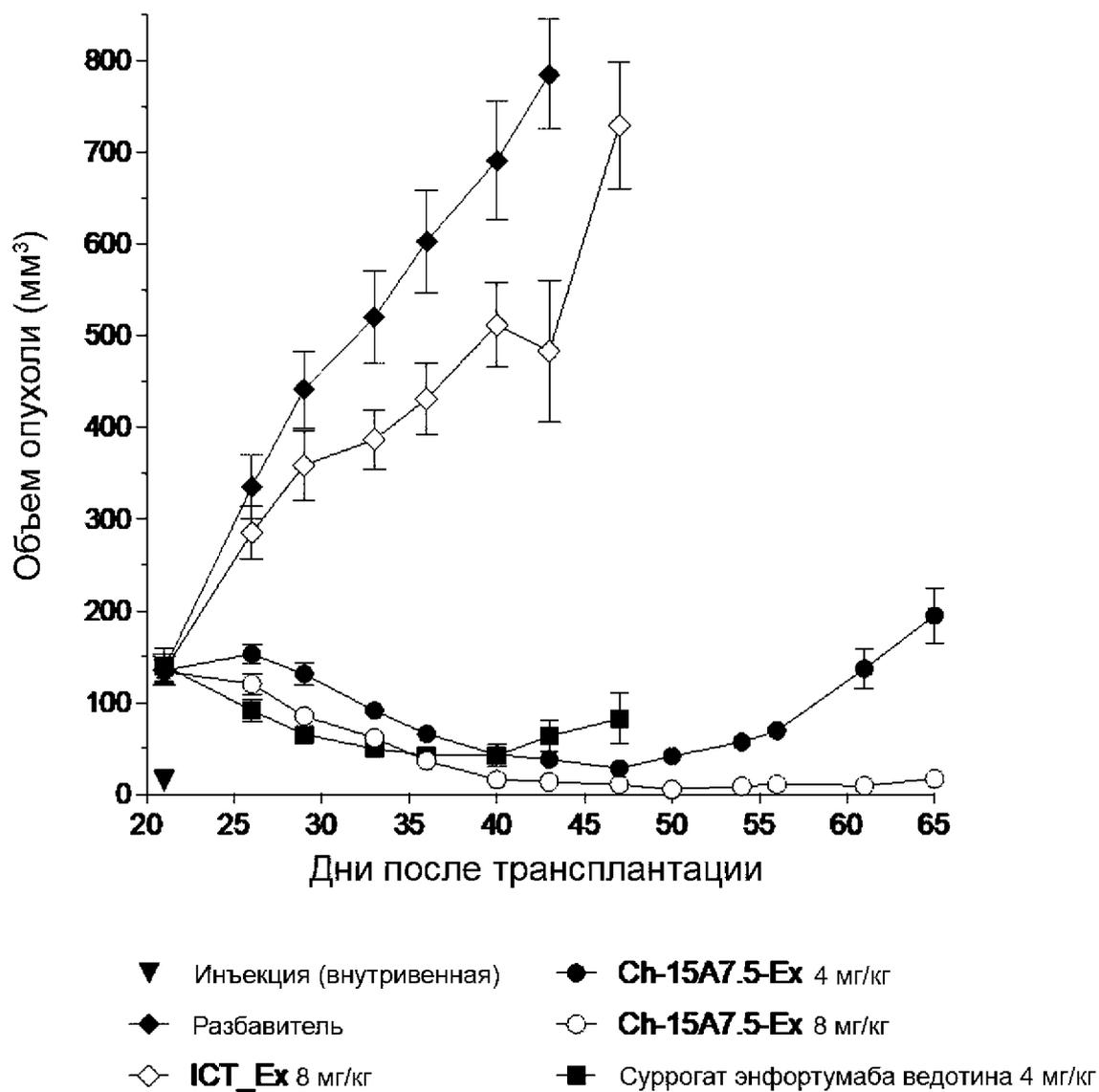
Фиг. 8

А**Б**

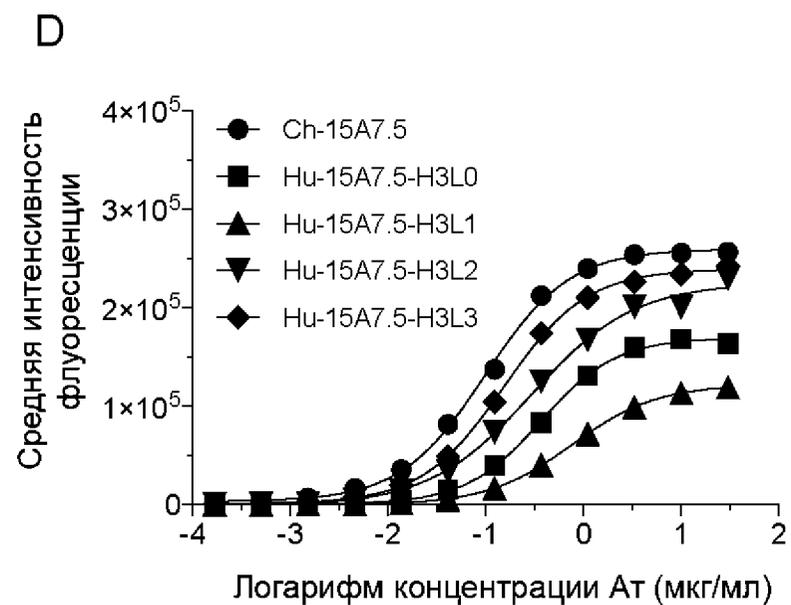
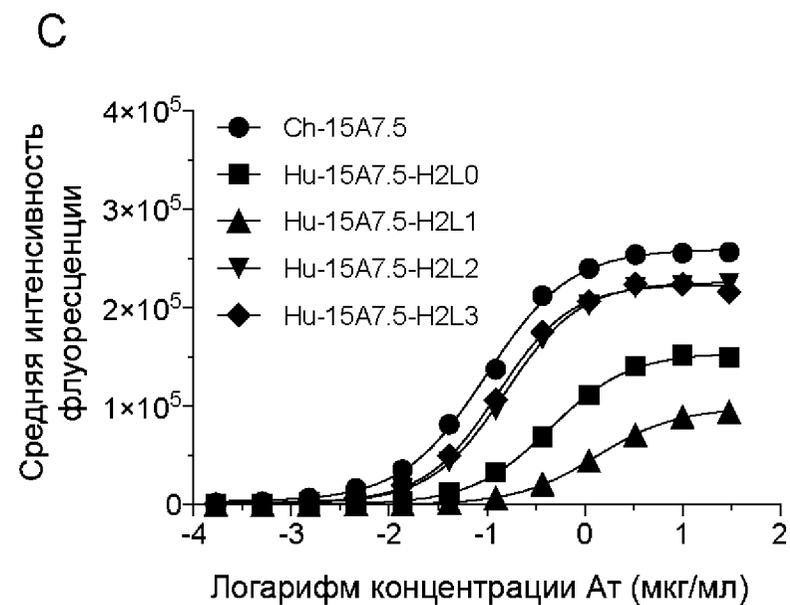
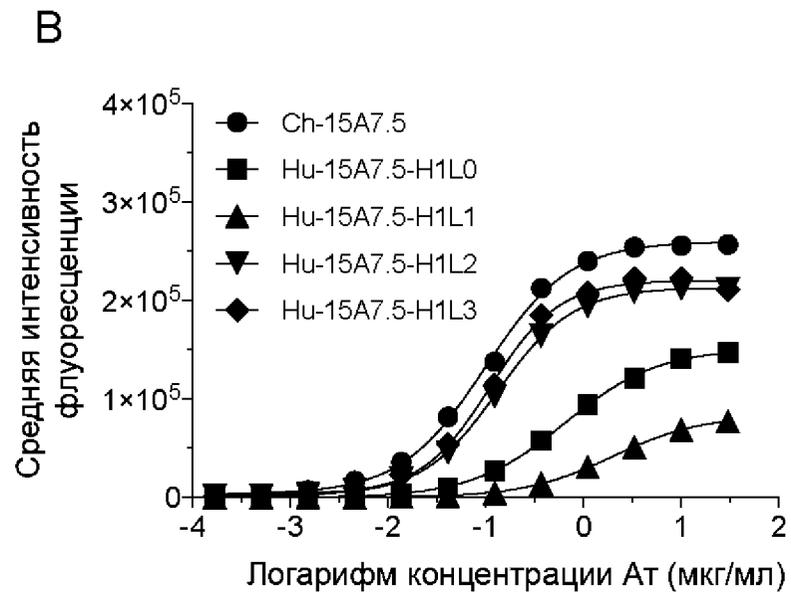
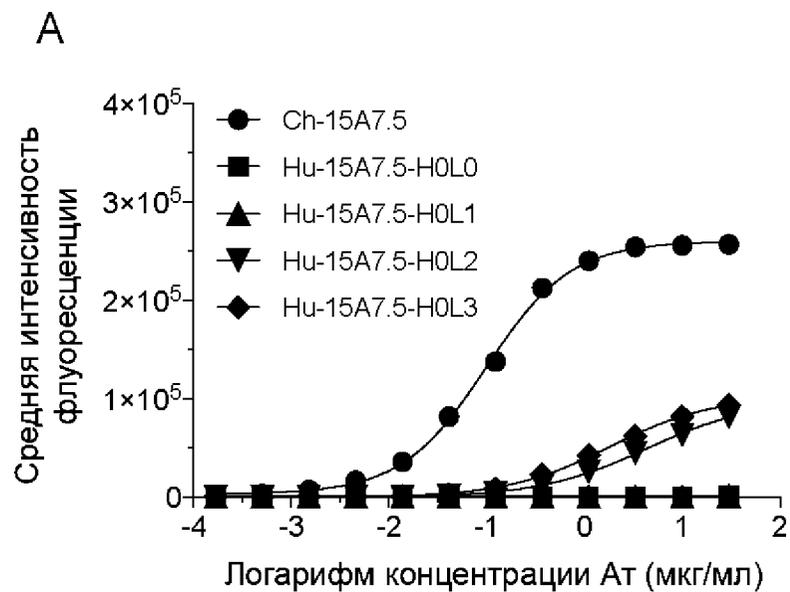
Фиг. 9



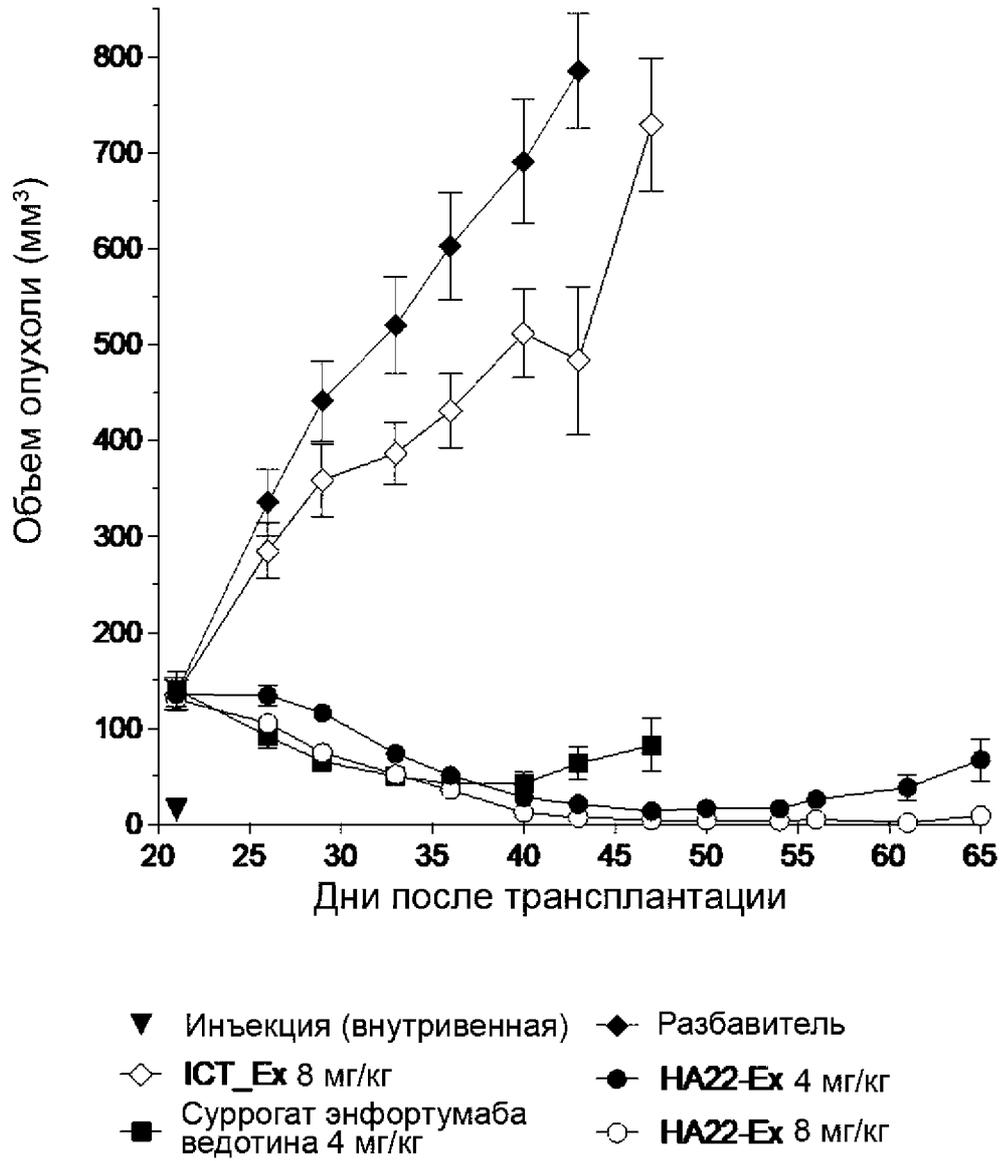
Фиг. 10



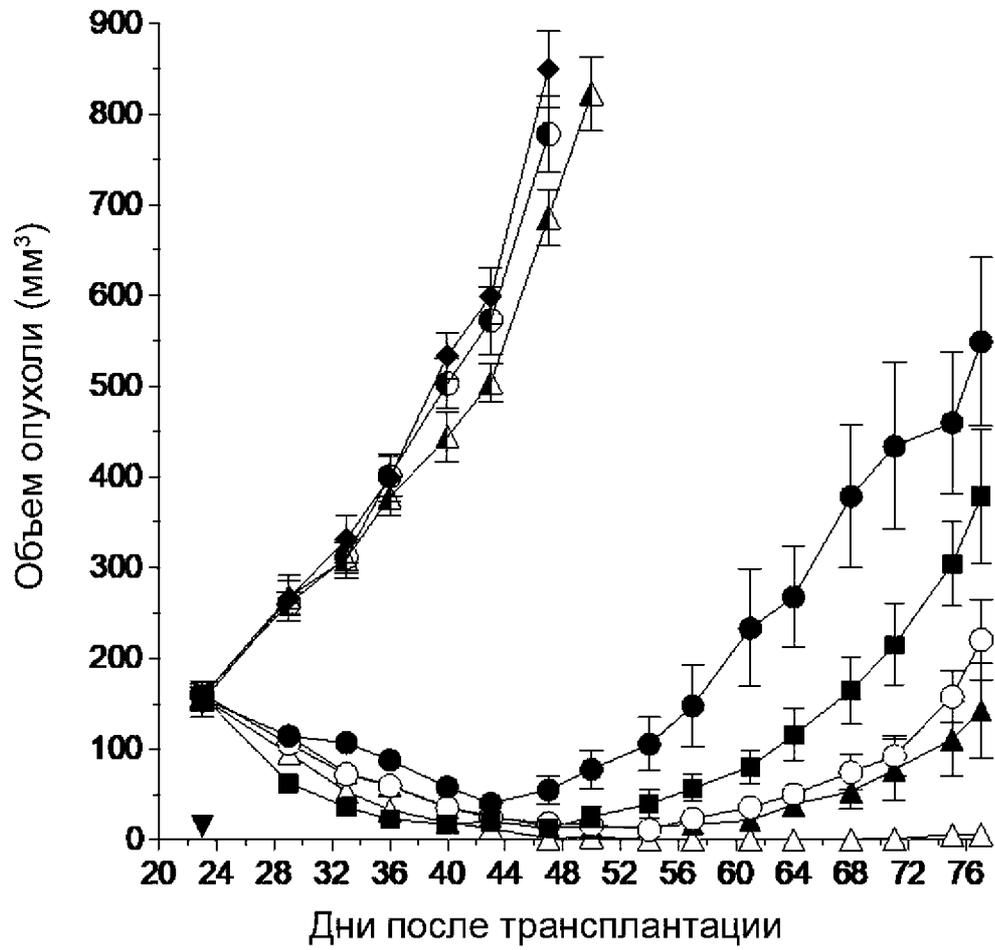
Фиг. 11



Фиг. 12

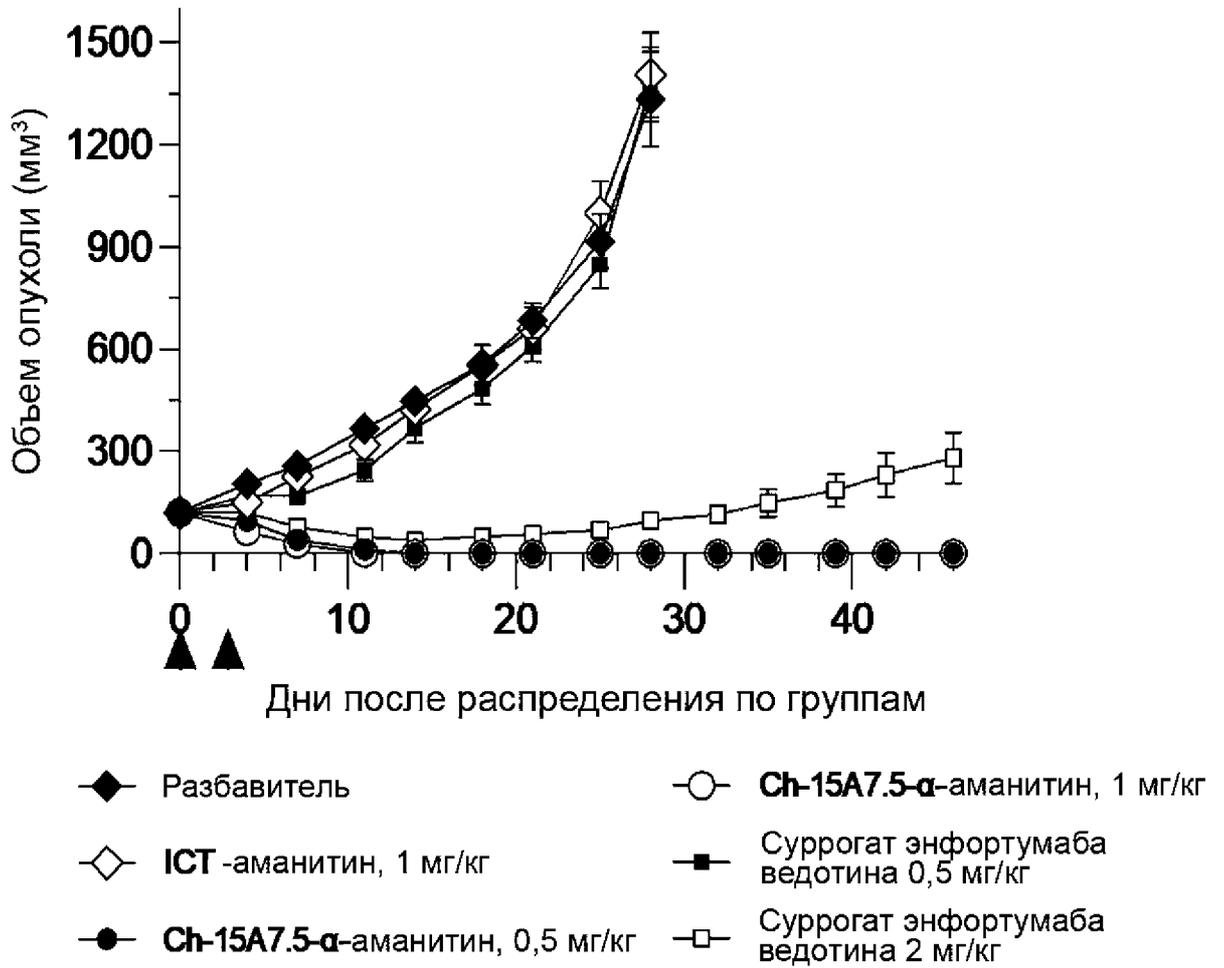


Фиг. 13

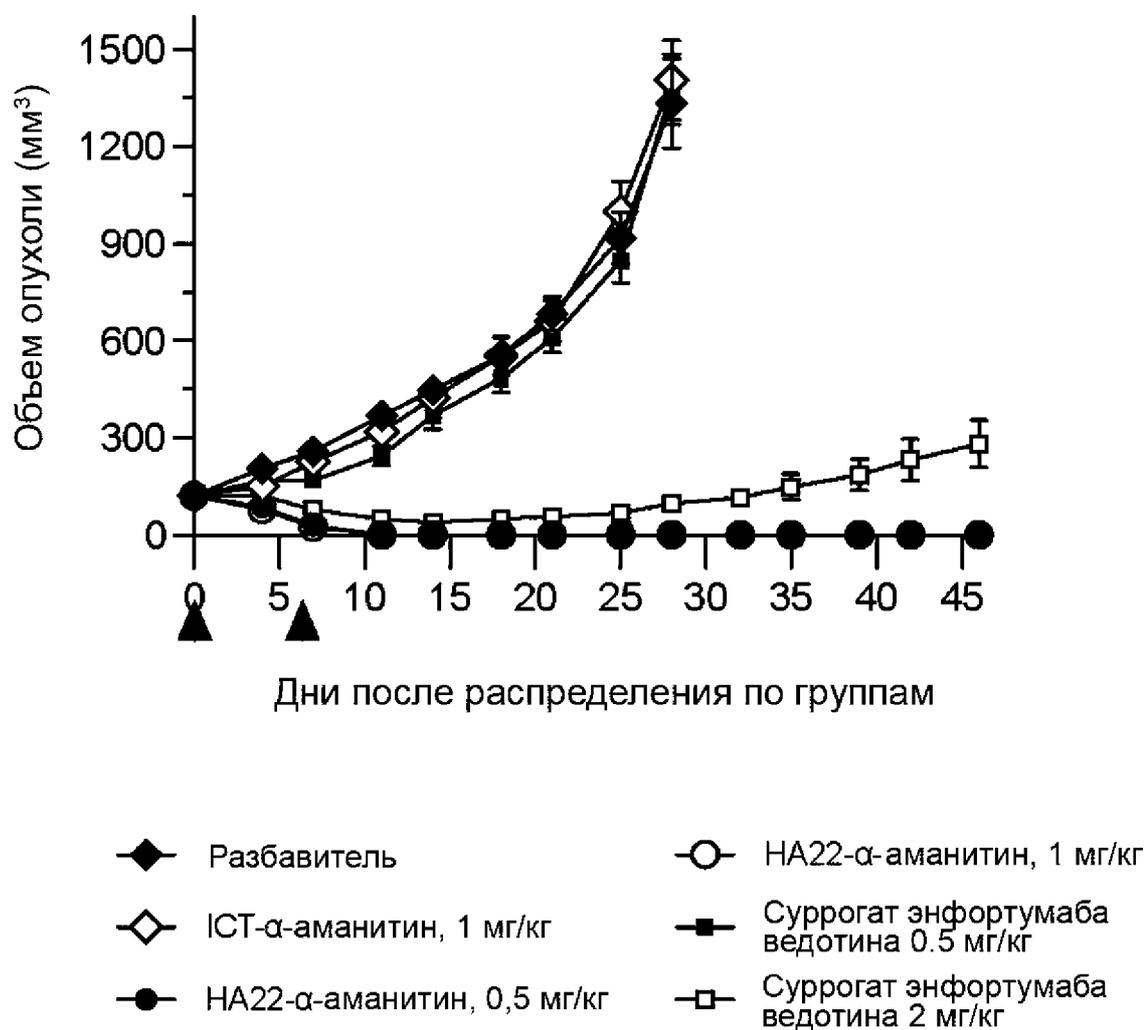


- △ HA22_Ex 8 мг/кг
- ▲ HA22_Ex 4 мг/кг
- HA22_Dxd 8 мг/кг
- HA22_Dxd 4 мг/кг
- ▼ Инъекция (внутривенная)
- ▲ ICT_Ex 8 мг/кг
- ⊕ ICT_Dxd 8 мг/кг
- EV 4 мг/кг
- ◆ Разбавитель

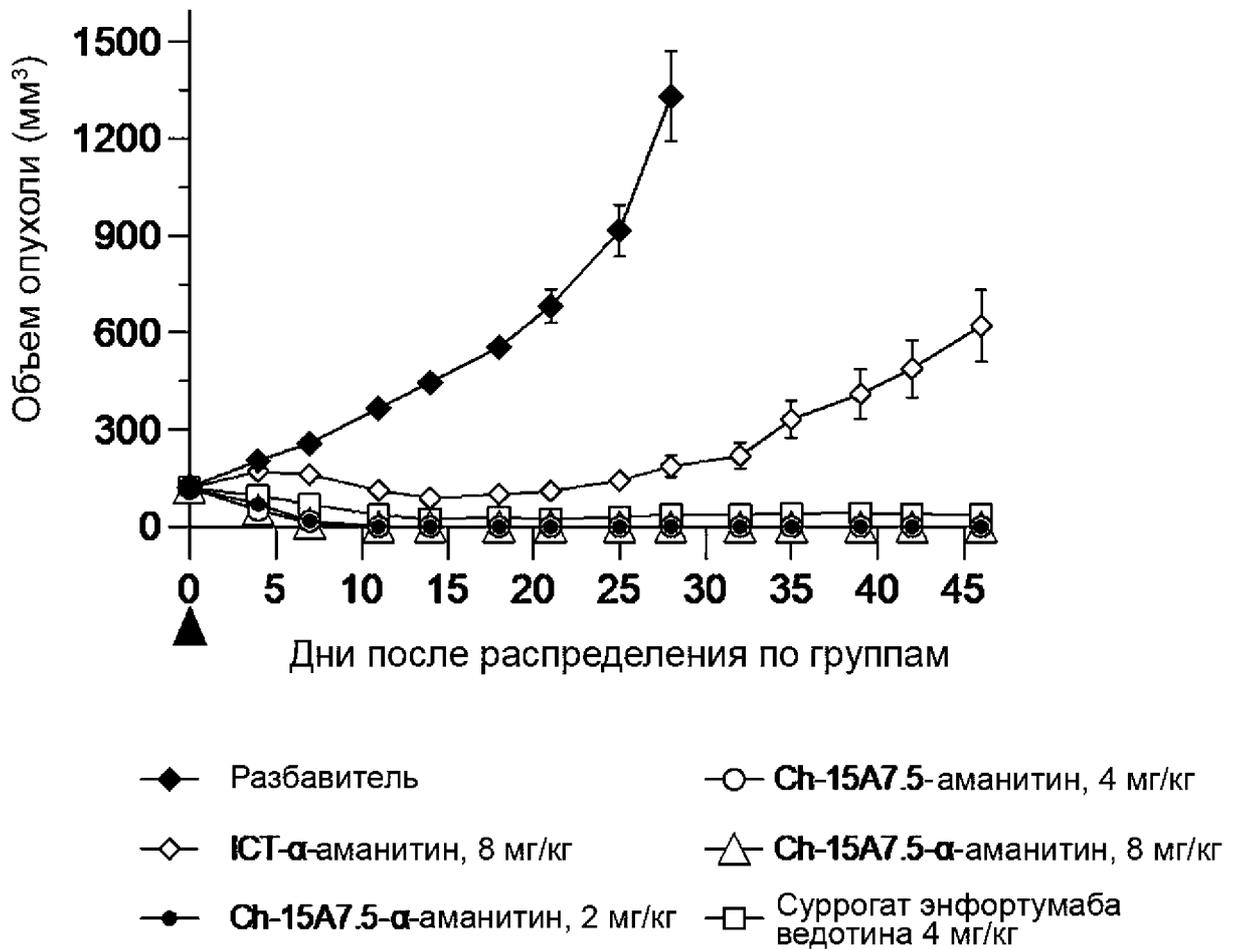
Фиг. 14



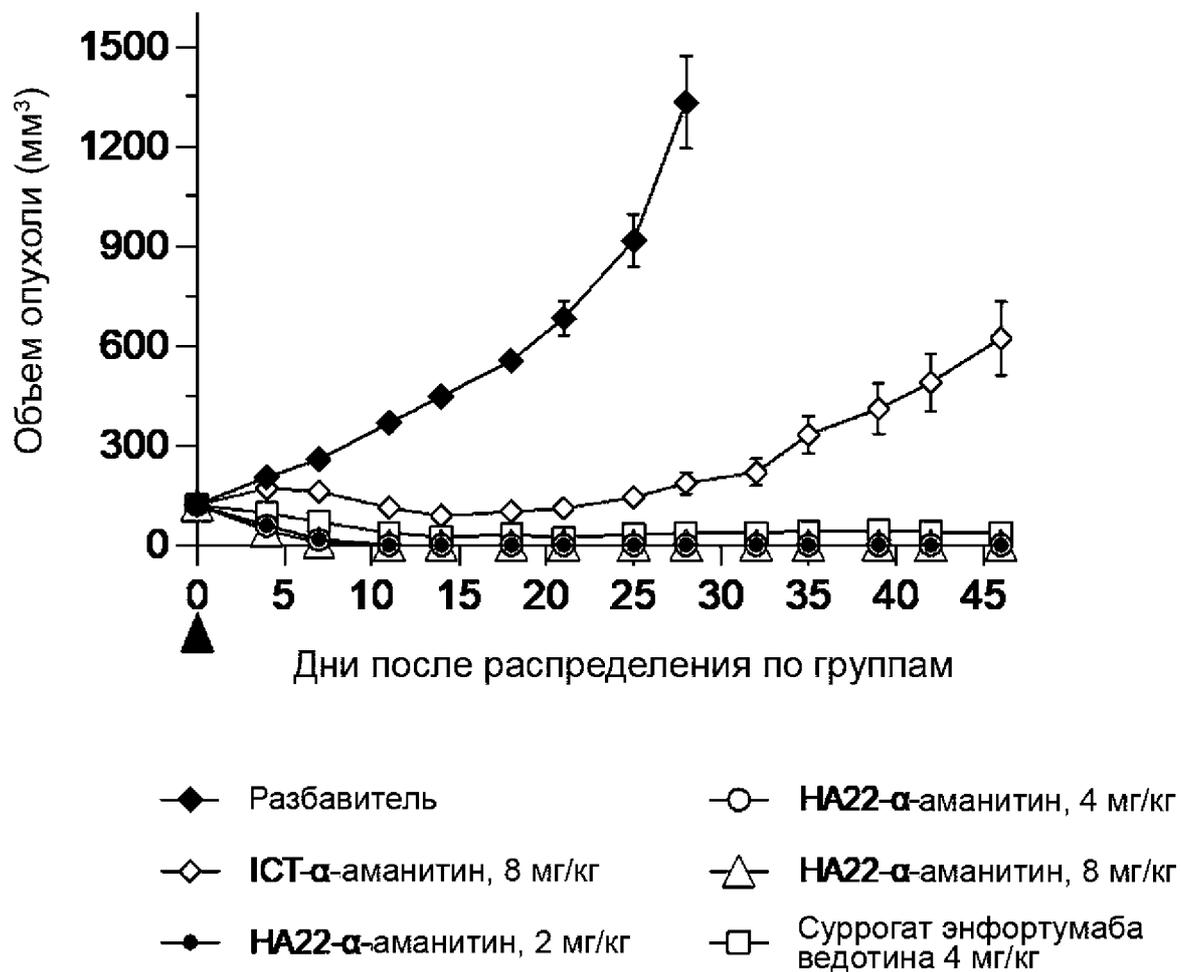
Фиг. 15



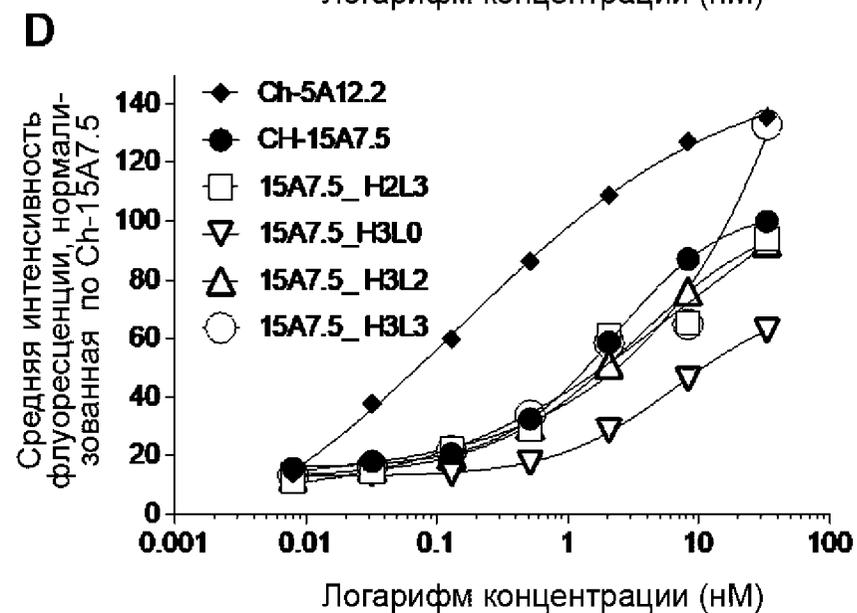
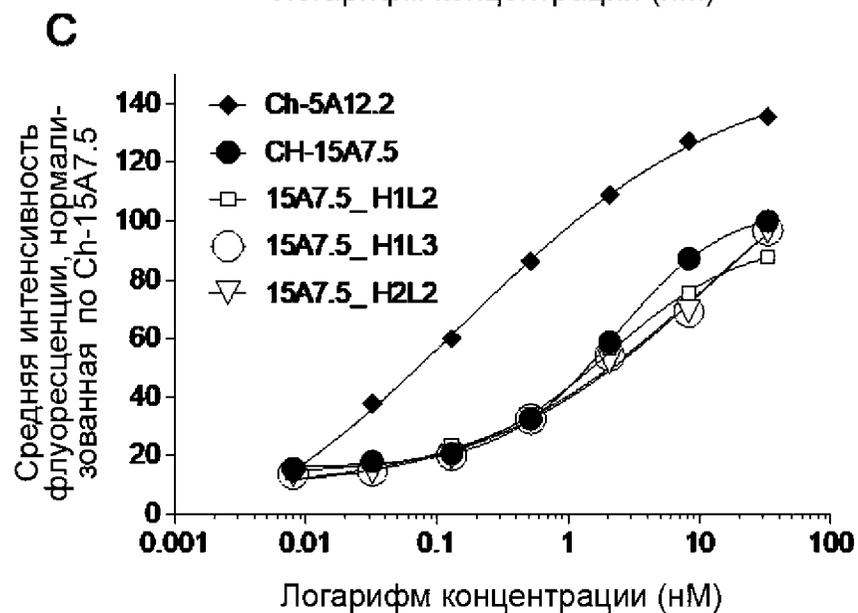
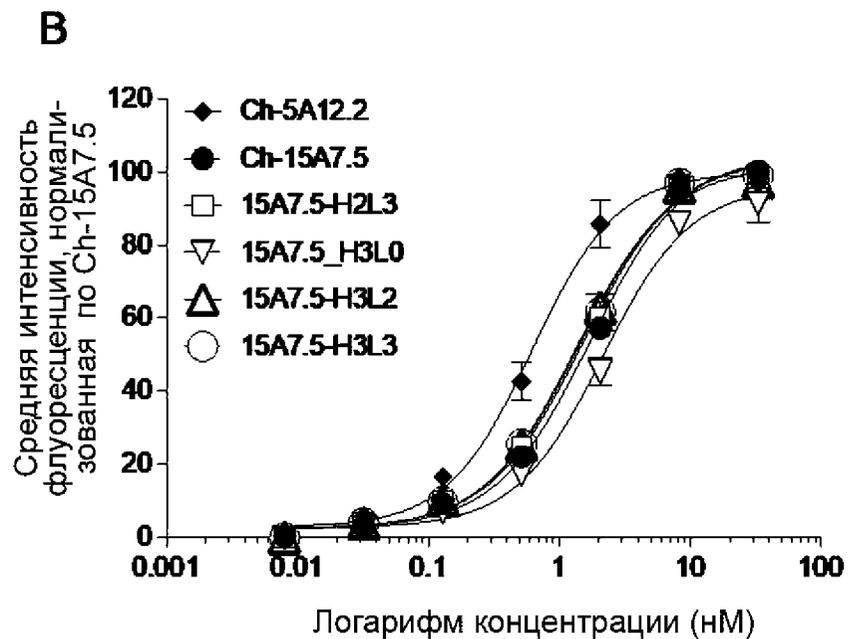
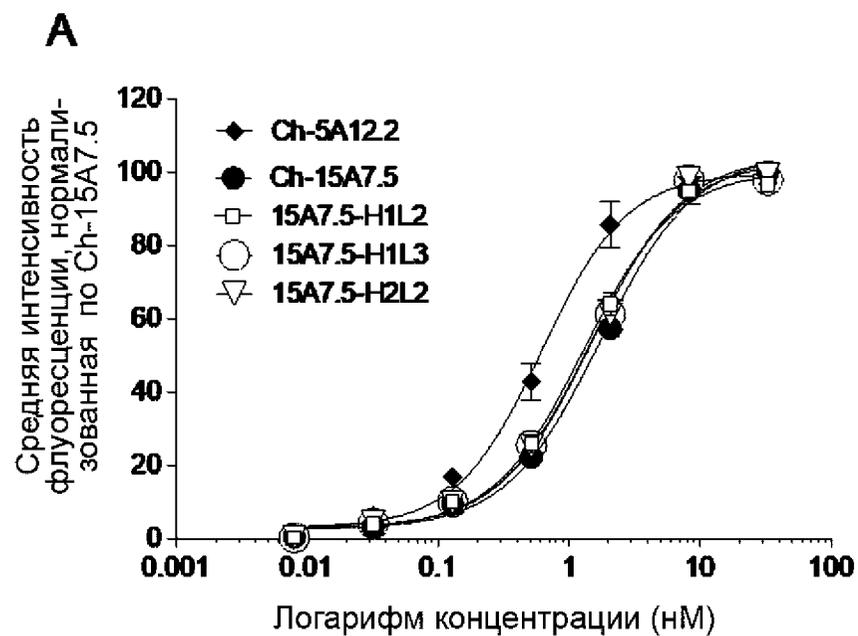
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

- Клон антитела 5A12.2

>VH_5A12.2

QIQLQQSGAELVKPGASVTLSCKTSGFTFNSMYISWLKQKPGQSLEWIAWIYAGTGGTRFN
QKFTGKVQLTVDTSSTAYMQFSSLTTDDSAIYYCAIRSGFVPMDYWGQGTSVTVSS

>VK_5A12.2

SIVMTQTPKFLLSAGDRVTITCKASQS^{VS}NDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDR
FTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPWTFGGGKLEIK

CDR : Номенклатура IMGT

- Клон антитела **9A2.7**

>VH_9A2.7

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYNFTTFWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSYANY
NQKFKDKATLTVDKSSTTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRPSYFGRNSFAYWGQGTLTVSA

>VK_9A2.7

DIVMTQSPSSLVSVGEEKVTMSCKSSQSLLYSVNHKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR
ESGVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVKAEDLAVYYCCHQYYTYPLTFGAGTKLELK

(CDR : Номенклатура IMGT

Фиг. 21

- Клон антитела 3A1.4

>VH_3A1.4

DVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSITSGYWNWIRKFPGNKLEYMGYISNSGITYYNP
SLKSRISITRDTSKNQYFLQLNSVTAEDTATYYCTRFGSTMILYYTMDYWGQGTSVTVSS

>VK_3A1.4

DIVMTQSPVTLSTPGDRVSLSCRASQSDYLHWYQQKSQESPRLLIKYASKSIGIPSRF
SGSGSGSNFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELK

CDR : Номенклатура IMGT

Фиг. 22

■ Клон антитела: 8F06

>VH_8F06

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTK
YNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCVTLFAYWGQGTLVTVSA

>VK_8F06

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSISYMHWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPARF
SGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQRSSYPFTFGSGTKLEIK

CDR : Номенклатура IMGT

Фиг. 23

- Клон исходного антитела 15A7.5

>VH_15A7.5

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSNYGMAWVRQAPGKGPEWVAFISNLAYGI
NYADTVTGRFTISRENAKNTLYLEMRLRSEDTAMYYCARGGARATGWFAYWGQGTTLVT
VSA

>VK_15A7.5

DIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTCKKASQNVDTHVAWYQEKPQQSPKALIYSASYRYSGVP
DRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIK

CDR : Номенклатура IMGT, номенклатура Kabat

Фиг. 24

- Гуманизированные варианты 15A7.5

> H0_15A7.5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA^SGFTF^SNYG^MMWVRQAPGKGLEWV F^ISNLAYG^I^N
YADSVKGR^RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY^CA^RGARATGWFA^WWGQGLTVTS
 S

> H1_15A7.5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA^SGFTF^SNYG^MA^WVRQAPGKGLEWV^SF^ISNLAYG^I^N
YADTVTG^RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY^CA^RGARATGWFA^WWGQGLTVT
 SS

>H2_15A7.5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA^SGFTF^SNYG^MA^WVRQAPGKGLEWV^{A^F}I^SNLAYG^I
^NYADTVTG^RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY^CA^RGARATGWFA^WWGQGLTVT
 VSS

>H3_15A7.5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA^SGFTF^SNYG^MA^WVRQAPGKGP^{E^W}F^ISNLAYG^I
^NYADTVTG^RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY^CA^RGARATGWFA^WYWGQGLTVT
 VSS

> L0_15A7.5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT^CRA^SQNV^DTH^VAWFQQKPGKAPKSLI^YSAS^YLQSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY^CQQYNSYPL^T^FGGGTKVEIK

>L1_15A7.5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT^CKA^SQNV^DTH^VA^WFQQKPGKAPKSLI^YSAS^YRY^S^{G^V}
 PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY^CQQYNSYPL^T^FGGGTKVEIK

> L2_15A7.5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT^CKA^SQNV^DTH^VA^WYQQKPGKAPKALI^YSAS^YRY^S^{G^V}
 PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY^CQQYNSYPL^T^FGGGTKVEIK

> L3_15A7.5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT^CKA^SQNV^DTH^VA^WYYQQKPGKSPKALI^YSAS^YRY^S^{G^V}
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY^CQQYNSYPL^T^FGGGTKVEIK

CDR: номенклатура IMGT/ номенклатура Kabat/ якорь IMGT и/или Kabat/ обратные мутации

Фиг. 25

Гуманизированные варианты 15A7.5

Клон/вариант	KD (нМ)	Ka (1/Мс)	Kdis (1/с)	R ²
Ch-15A7.5	45.9	7.52 ^{E+04}	3.45 ^{E-03}	0.98
15A7.5_H1L2	52	8.01 ^{E+04}	4.16 ^{E-03}	0.97
15A7.5_H1L3	50	8.24 ^{E+04}	4.12 ^{E-03}	0.97
15A7.5_H2L2	59.7	7.79 ^{E+04}	4.65 ^{E-03}	0.97
15A7.5_H2L3	60	8.00 ^{E+04}	4.80 ^{E-03}	0.97
15A7.5_H3L2	55.5	8.81 ^{E+04}	4.89 ^{E-03}	0.97
15A7.5_H3L3	58.1	7.86 ^{E+04}	4.57 ^{E-03}	0.97
15A7.5_H0L3	<i>Нерелевантный</i>	<i>Нерелевантный</i>	<i>Нерелевантный</i>	0.92

Фиг. 26