

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392919 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.07.11(22) Дата подачи заявки  
2022.04.26(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 47/68 (2017.01)  
A61K 31/4745 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

## (54) АНТИТЕЛО ПРОТИВ НЕКТИНА-4 И КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО ПРОТИВ НЕКТИНА-4-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ

(31) 202110455570.X

(32) 2021.04.26

(33) CN

(86) PCT/CN2022/089129

(87) WO 2022/228406 2022.11.03

(71) Заявитель:

ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО.,  
ЛТД.; ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)

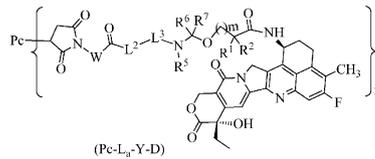
(72) Изобретатель:

Ян Ян, Чжан Хаоин, Тао Вэйкан (CN)

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

(57) Предложены антитело против нектина-4 и конъюгат антитело против нектина-4 с лекарственным средством, а также их применение в медицинских целях. Участвуют антитело против нектина-4 и конъюгат антитело против нектина-4 с лекарственным средством, представленные общей формулой (Pc-L-Y-D), где Pc представляет собой антитело против нектина-4, а L, Y и n являются такими, как указано в описании.



A1

202392919

202392919

A1

## АНТИТЕЛО ПРОТИВ НЕКТИНА-4 И КОНЪЮГАТ АНТИТЕЛО ПРОТИВ НЕКТИНА-4-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

5 Настоящее изобретение относится к антителу против нектина-4 и конъюгату антитело против нектина-4-аналог эксцатекана, способу их получения, содержащей их фармацевтической композиции и их применению в получении лекарственного средства для лечения опосредованного нектином-4 заболевания или расстройства, в частности, в получении противоракового лекарственного средства.

10

### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Приведенные в данном документе положения лишь предоставляют базовую информацию, относящуюся к настоящему изобретению, и не обязательно могут составлять предшествующий уровень техники.

15 Нектин-4 (PVRL4) представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа массой 66 кДа и принадлежит к семейству нектинов суперсемейства Ig. Он играет ключевую роль в различных биологических процессах (пролиферации, дифференциации и миграции) эпителиальных, эндотелиальных, иммунных и нервных клеток. Исследования показывают, что нектин-4 играет важную роль в развитии, инфильтрации и  
20 метастазировании тканей злокачественных опухолей, таких как рак мочевого пузыря, рак молочной железы и рак легкого. Данная роль связана с активацией Cdc42 и Rac, а также с изменением цитоскелетного актина и вызывает пролиферацию, инфильтрацию и метастазирование опухолевых клеток.

Нектин-4 представляет собой опухоль-специфический антиген. Он  
25 экспрессируется в 50% случаев рака мочевого пузыря, 49% случаев рака молочной железы и 86% случаев рака легкого и часто обнаруживается в опухолях с плохим прогнозом, однако его экспрессия не обнаруживается в большинстве нормальных тканей. Приведенная выше информация дает основание полагать, что нектин-4 может быть идеальной мишенью для лечения опухолей.

30 Энфортумаб ведотин (Падцев), раскрытый в WO 2012047724, представляет собой нацеленный на нектин-4 конъюгат, связанный с ММАЕ. Его можно использовать для лечения местно-распространенного или метастатического уротелиального рака у пациентов, ранее получавших платиносодержащую химиотерапию и лечение ингибиторами PD-1/L1 (Европейская комиссия одобрила PADCEV (энфортумаб ведотин)  
35 для лечения местно-распространенного или метастатического уротелиального рака. Пресс-релиз , Seagen Inc, 13 апреля 2022 г. По состоянию на 14 апреля 2022 г.). Огромное значение имеет разработка большего количества конъюгатов антитело-

лекарственное средство, мишенью которых является нектин-4, в качестве противоопухолевых препаратов для исследований.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Настоящее изобретение относится к антителу против нектина-4, конъюгату антитела против нектина-4 и аналога эксцатекана, а также к их применению.

Настоящее изобретение относится к антителу против нектина-4, причем указанное антитело против нектина-4 связывается с белком нектин-4, экспрессируемым клетками T47D или клетками MDA-MB-468, со значением  $EC_{50}$  менее 0,1 нМ, определяемым  
10 методом FACS.

В некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 6; и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 7.

15 В некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

а. переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, соответственно; а  
20 переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13, соответственно;

причем описанные выше HCDR1-3 и LCDR1-3 определяются по схеме нумерации Chothia.

В некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 согласно  
25 любому из вышеизложенного содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

б. переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, соответственно; а  
30 переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 13, соответственно;

причем описанные выше HCDR1-3 и LCDR1-3 определяются по схеме нумерации IMGT.

В некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 согласно  
35 любому из вышеизложенного содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

с. переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 10, соответственно; а

вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13, соответственно;

причем описанные выше HCDR1-3 и LCDR1-3 определяются по схеме нумерации Kabat.

5 В соответствии с настоящим изобретением предложено антитело против нектина-4, где указанное антитело против нектина-4 содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

а. вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, соответственно; а вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13, соответственно;

10 причем описанные выше HCDR1-3 и LCDR1-3 определяются по схеме нумерации Chothia.

В соответствии с настоящим изобретением предложено антитело против нектина-4, где указанное антитело против нектина-4 содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

15 б. вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, соответственно; а вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 13, соответственно;

20 причем описанные выше HCDR1-3 и LCDR1-3 определяются по схеме нумерации IMGT.

В соответствии с настоящим изобретением предложено антитело против нектина-4, где указанное антитело против нектина-4 содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

25 с. вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 10, соответственно; а вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13, соответственно;

30 причем описанные выше HCDR1-3 и LCDR1-3 определяются по схеме нумерации Kabat.

В некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного представляет собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

35 В некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем:

вариабельная область тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 6, и /или вариабельная область легкой цепи имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательностей с SEQ ID NO:7 ;

в некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем:

вариабельная область тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 6, а вариабельная область легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 7; или

в некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного дополнительно содержит константную область тяжелой цепи антитела и константную область легкой цепи антитела; предпочтительно константная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека, а константная область легкой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей  $\kappa$  и  $\lambda$ -цепей человеческого антитела; более предпочтительно, антитело содержит константную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO: 4, и константную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного содержит:

тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 21, и/или легкую цепь, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного содержит:

тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного связывается с белком нектин-4, экспрессируемым клетками T47D или клетками MDA-MB-468, со значением  $EC_{50}$  менее 0,1 нМ, определяемым посредством FACS.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложено антитело против нектина-4, где указанное антитело конкурирует за связывание с нектином-4 человека с антителом против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения также предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного.

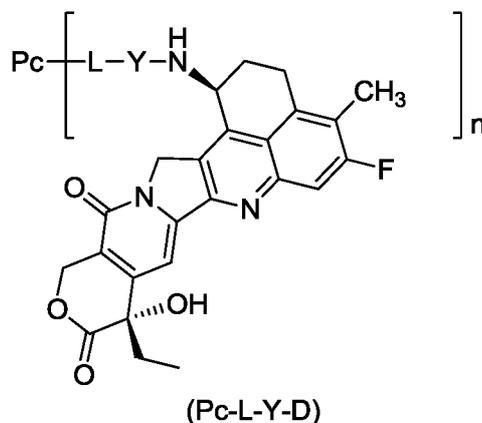
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения также предложена клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из вышеизложенного.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения также предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного или молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения также предложен иммуноконъюгат, содержащий антитело против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного и эффекторную молекулу, причем эффекторная молекула связана с антителом против нектина-4; предпочтительно эффекторная молекула выбрана из группы, состоящей из радиоизотопа, противоопухолевого средства, иммуномодулятора, модификатора биологического ответа, лектина, цитотоксического лекарственного средства, хромофора, флуорофора, хемилюминесцентного соединения, фермента, иона металла и любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения также предложен способ иммунодетекции или определения нектина-4, причем указанный способ включает стадию приведения в контакт антитела против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного с субъектом или образцом от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения также предложен конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемая соль:



где:

Y выбран из группы, состоящей из  $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ,  $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$ ,  $-O-CR^1R^2-$ ,  $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$  и  $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ;

$R^a$  и  $R^b$  являются одинаковыми или разными и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, дейтерия, галогена, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила, алкокси, гидрокси, амино, циано, нитро, гидроксиалкила, циклоалкила и гетероциклила; или  $R^a$  и  $R^b$  вместе с атомом углерода, к которому они  
5 присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

$R^1$  выбран из группы, состоящей из галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила;  $R^2$  выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила,  
10 гетероциклила, арила и гетероарила; или  $R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

или  $R^a$  и  $R^2$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

$m$  представляет собой целое число от 0 до 4; в качестве неограничивающего  
15 примера  $m$  выбран из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4;

$n$  равно от 1 до 10;

$L$  представляет собой линкерное звено;

$Pc$  представляет собой антитело против нектин-4 согласно любому из вышеизложенного.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитело-лекарственное  
20 средство общей формулы ( $Pc-L-Y-D$ ) или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вышеизложенного  $n$  равно от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления  $n$  равно от 3 до 8.

В некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат антитело-  
25 лекарственное средство общей формулы ( $Pc-L-Y-D$ ) или его фармацевтически приемлемая соль согласно любому из вышеизложенного,

где

$Y$  представляет собой  $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ;

$R^a$  и  $R^b$  являются одинаковыми или разными и каждый независимо выбран из  
30 группы, состоящей из водорода, дейтерия, галогена и  $C_{1-6}$  алкила;

$R^1$  представляет собой  $C_{1-6}$  галогеналкил или  $C_{3-6}$  циклоалкил;

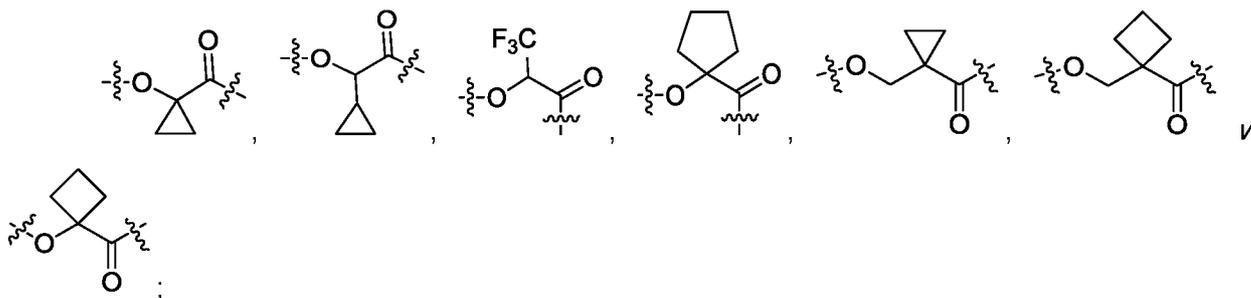
$R^2$  выбран из группы, состоящей из атома водорода,  $C_{1-6}$  галогеналкила и  $C_{3-6}$  циклоалкила;

или  $R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют  $C_{3-6}$   
35 циклоалкил;

$m$  равно 0 или 1.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитело-лекарственное  
средство общей формулы ( $Pc-L-Y-D$ ) или его фармацевтически приемлемой соли

согласно любому из вышеизложенного, Y выбран из группы, состоящей из:



при этом O-конец в Y соединен с линкерным звеном L.

5 В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вышеизложенного, линкерное звено -L- представляет собой -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>-L<sup>4</sup>-, где

L<sup>1</sup> выбран из группы, состоящей из -(сукцинимидил-3-ил-N)-W-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-  
10 NR<sup>3</sup>-W-C(O)- и -C(O)-W-C(O)-, где W выбран из группы, состоящей из C<sub>1-6</sub> алкилена и C<sub>1-6</sub> алкилен-C<sub>3-6</sub> циклоалкила, где каждый из C<sub>1-6</sub> алкилена и C<sub>1-6</sub> алкилен-C<sub>3-6</sub> циклоалкила возможно независимо дополнительно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, amino, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> галогеналкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси и C<sub>1-6</sub> циклоалкила;

15 L<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sup>p</sup>1CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sup>p</sup>1CH<sub>2</sub>C(O)-, -S(CH<sub>2</sub>)<sup>p</sup>1C(O)- и химической связи, где p<sup>1</sup> представляет собой целое число от 1 до 20;

L<sup>3</sup> представляет собой пептидный остаток, состоящий из 2-7 аминокислотных остатков, причем указанные аминокислотные остатки выбраны из группы, состоящей из  
20 аминокислотных остатков, образовавшихся из следующих аминокислот: фенилаланин (F), аланин (A), глицин (G), валина (V), лизин (K), цитруллин, серин (S), глутаминовая кислота (E) и аспарагиновая кислота (D); и возможно дополнительно замещены одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, amino, алкила, хлоралкила, дейтерированного алкила, алкокси и циклоалкила;

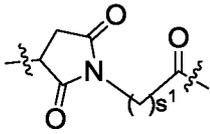
25 L<sup>4</sup> выбран из группы, состоящей из -NR<sup>5</sup>(CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>)<sub>t</sub>-, -C(O)NR<sup>5</sup>-, -C(O)NR<sup>5</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>- и химической связи, где t представляет собой целое число от 1 до 6;

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> являются одинаковыми или разными и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> галогеналкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила и C<sub>1-6</sub> гидроксиалкила;

30 R<sup>6</sup> и R<sup>7</sup> являются одинаковыми или разными и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> галогеналкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила и C<sub>1-6</sub> гидроксиалкила.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли

согласно любому из вышеизложенного линкерное звено -L- представляет собой  $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ , где

$L^1$  представляет собой , а  $s^1$  представляет собой целое число от 2 до 8;

5  $L^2$  представляет собой химическую связь;

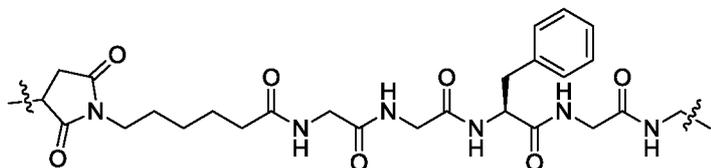
$L^3$  представляет собой тетрапептидный остаток;

$L^4$  представляет собой  $-NR^5(CR^6R^7)t-$ , где  $R^5$ ,  $R^6$  и  $R^7$  являются одинаковыми или разными, и каждый независимо представляет собой водород или  $C_{1-6}$  алкил, и  $t$  равно 1 или 2;

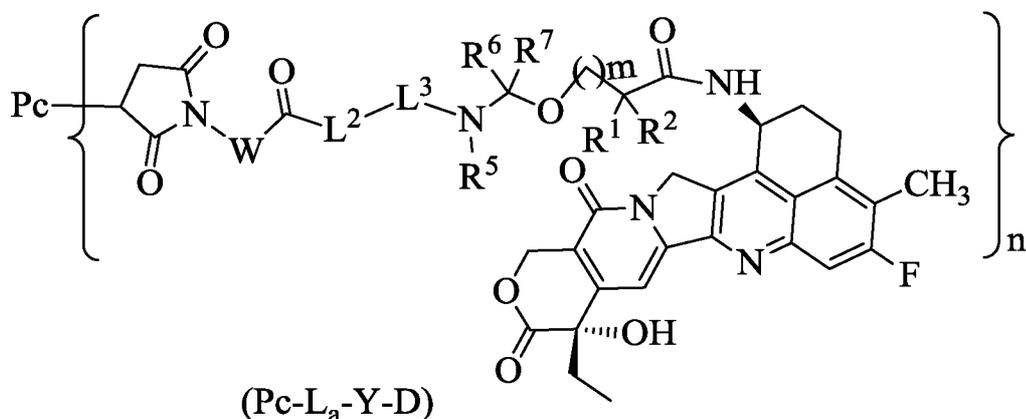
10  $L^1$ -конец линкера -L- соединен с Pc, а  $L^4$ -конец соединен с Y.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вышеизложенного  $L^3$  представляет собой тетрапептидный остаток GGFG (SEQ ID NO: 23).

15 В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вышеизложенного -L- представляет собой:



20 В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемая соль согласно любому из вышеизложенного представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L<sub>a</sub>-Y-D) или фармацевтически приемлемую соль:



где:

25 Pc представляет собой антитело против нектина-4, описанное выше;

m представляет собой целое число от 0 до 4;

n равно от 1 до 10;

R<sup>1</sup> выбран из группы, состоящей из галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила; R<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила; или R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

W выбран из группы, состоящей из C<sub>1-6</sub> алкилена и C<sub>1-6</sub> алкилен-C<sub>3-6</sub> циклоалкила, где каждый из C<sub>1-6</sub> алкилена и C<sub>1-6</sub> алкилен-C<sub>3-6</sub> циклоалкила возможно независимо дополнительно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксигруппы, циано, аминогруппы, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> хлоралкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси и C<sub>3-6</sub> циклоалкила;

L<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sup>p</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sup>p</sup>CH<sub>2</sub>C(O)-, -S(CH<sub>2</sub>)<sup>p</sup>C(O)- и химической связи, где p<sup>1</sup> представляет собой целое число от 1 до 20;

L<sup>3</sup> представляет собой пептидный остаток, состоящий из 2-7 аминокислотных остатков, причем указанные аминокислотные остатки выбраны из группы, состоящей из аминокислотных остатков, образованных из аминокислот фенилаланина (F), аланина (A), глицина (G), валина (V), лизина (K), цитруллина, серина (S), глутаминовой кислоты (E) и аспарагиновой кислоты (D), и возможно дополнительно замещены одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксигруппы, циано, аминогруппы, алкила, хлоралкила, дейтерированного алкила, алкокси и циклоалкила;

R<sup>5</sup> выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила и гидроксилалкила;

R<sup>6</sup> и R<sup>7</sup> являются одинаковыми или разными и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила и гидроксилалкила.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемая соль согласно любому из вышеизложенного представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L<sub>a</sub>-Y-D) или его фармацевтически приемлемую соль, где

Pc представляет собой антитело против нектин-4 в соответствии с любым из вышеизложенного;

m представляет собой целое число от 0 до 4;

n равно от 1 до 10;

R<sup>1</sup> выбран из группы, состоящей из галогена, C<sub>1-6</sub> галогеналкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>3-6</sub> циклоалкила, C<sub>3-6</sub> циклоалкил-C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси-

$C_{1-6}$  алкила, гетероциклила, арила и гетероарила;  $R^2$  выбран из группы, состоящей из водорода, галогена,  $C_{1-6}$  галогеналкила, дейтерированного  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{3-6}$  циклоалкила,  $C_{3-6}$  циклоалкил- $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  алкокси- $C_{1-6}$  алкила, гетероциклила, арила и гетероарила; или  $R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют  $C_{3-6}$ -циклоалкил или гетероциклил;

$W$  выбран из группы, состоящей из  $C_{1-6}$  алкилена и  $C_{1-6}$  алкилен- $C_{3-6}$  циклоалкила, где каждый из  $C_{1-6}$  алкилена и  $C_{1-6}$  алкилен- $C_{3-6}$  циклоалкила возможно независимо дополнительно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидрокси, циано, амина,  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  хлоралкила, дейтерированного  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  алкокси и  $C_{3-6}$  циклоалкила;

$L^2$  выбран из группы, состоящей из  $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)-$ ,  $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ ,  $-S(CH_2)p^1C(O)-$  и химической связи, где  $p^1$  представляет собой целое число от 1 до 20;

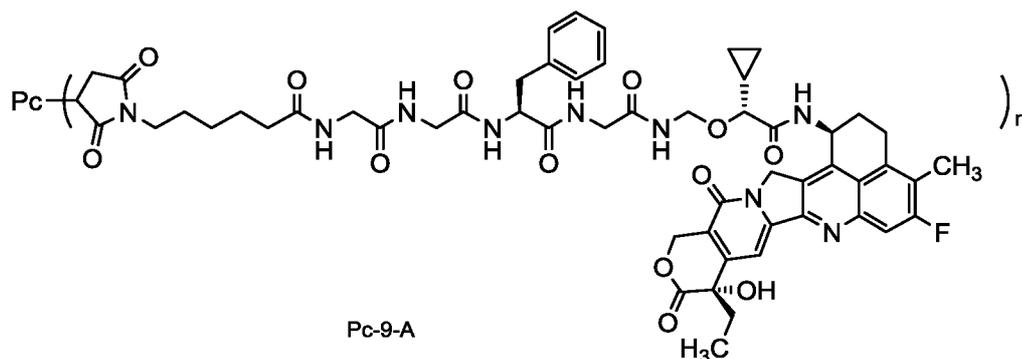
$L^3$  представляет собой пептидный остаток, состоящий из 2-7 аминокислотных остатков, причем указанный аминокислотные остатки выбраны из группы, состоящей из аминокислотных остатков, образованных из аминокислот фенилаланина (F), аланина (A), глицина (G), валина (V), лизина (K), цитруллина, серина (S), глутаминовой кислоты (E) и аспарагиновой кислоты (D), и возможно дополнительно замещены одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидрокси, циано, амина,  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  хлоралкила, дейтерированного  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  алкокси и  $C_{3-6}$  циклоалкила;

$R^5$  выбран из группы, состоящей из водорода,  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  галогеналкила, дейтерированного  $C_{1-6}$  алкила и  $C_{1-6}$  гидроксиалкила;

$R^6$  и  $R^7$  являются одинаковыми или разными и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, галогена,  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  галогеналкила, дейтерированного  $C_{1-6}$  алкила и  $C_{1-6}$  гидроксиалкила;

гетероциклил содержит от 3 до 6 кольцевых атомов, из которых от 1 до 3 представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода и серы.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеизложенного конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой:



где:

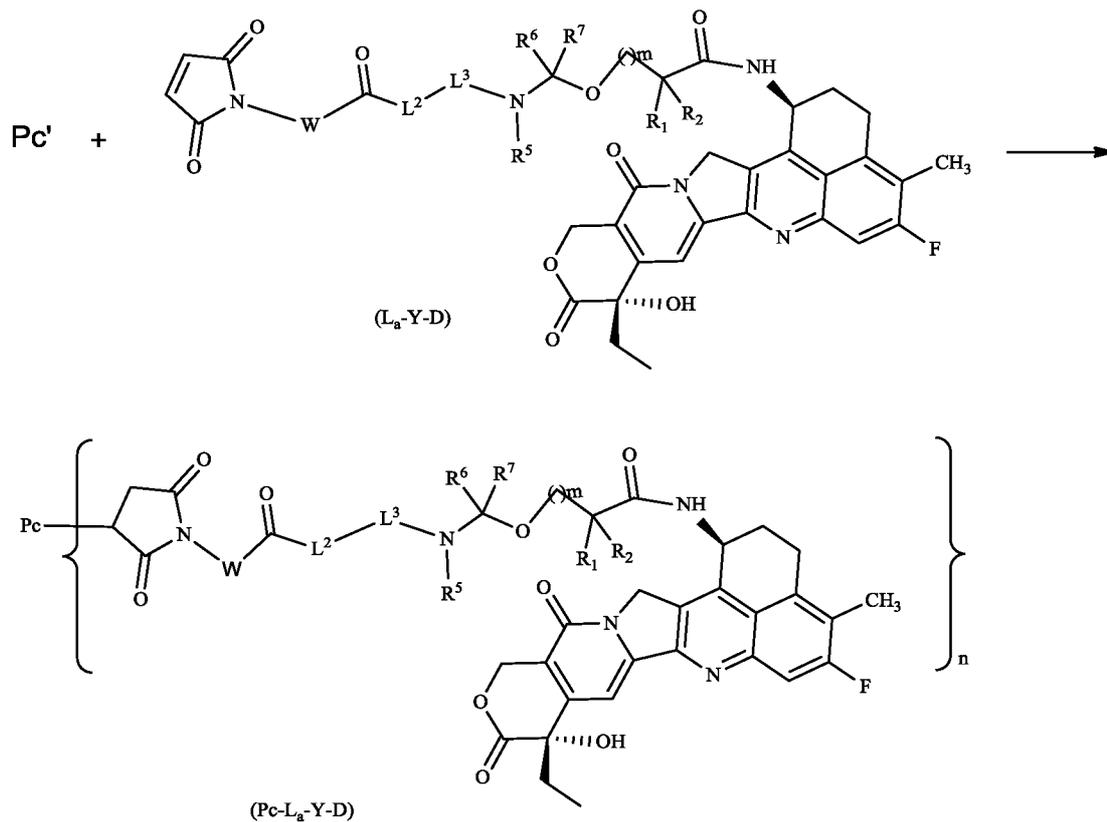
n равно от 1 до 8;

Pc представляет собой антитело против нектина-4, содержащее тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеизложенного n равно от 1 до 8.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеизложенного неограничивающий пример m выбран из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложен способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L<sub>a</sub>-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеизложенного, включающий следующую стадию:



проведение реакции сочетания Pc' с соединением общей формулы (L<sub>a</sub>-Y-D) с получением соединения общей формулы (Pc-L<sub>a</sub>-Y-D);

5 в которой:

Pc' получен путем восстановления Pc;

n, m, W, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup>, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> и R<sup>7</sup> имеют значения, определенные выше.

В некоторых вариантах осуществления n представляет собой среднее значение от 0 до 10, предпочтительно 1-10, более предпочтительно 1-8, или 2-8, или 2-7, или 2-4, или 3-8, или 3-7, или 3-6, или 4-7, или 4-6, или 4-5; в некоторых вариантах осуществления n представляет собой среднее значение из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против нектина-4 согласно любому из вышеизложенного, или молекулу нуклеиновой кислоты согласно 15 любому из вышеизложенного, или конъюгат антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с любым из вышеизложенного, и один или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, разбавителей или носителей.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно 20 предложено применение антитела против нектина-4 в соответствии с любым из вышеизложенного, или молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вышеизложенного, или конъюгата антитело-лекарственное средство, или его

фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеизложенного, или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вышеизложенного для получения лекарственного средства для лечения опосредованного нектином-4 заболевания или расстройства.

5 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложено применение антител<sup>1</sup> против нектина-4 в соответствии с любым из вышеизложенного, или молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вышеизложенного, или конъюгата антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеизложенного, или  
10 фармацевтической композиции в соответствии с любым из вышеизложенного для получения лекарственного средства для лечения и/или предупреждения опухолей и раковых заболеваний, где опухоли и раковые заболевания выбраны из группы, состоящей из рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака пищевода, немелкоклеточного рака легкого, опухолей гортани, опухолей глотки, опухолей полости  
15 рта, рака желудка, рака яичников, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака головы и шеи, плоскоклеточного рака и меланомы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложен набор, содержащий антитело против нектина-4 в соответствии с любым из вышеизложенного, или молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из  
20 вышеизложенного, или конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с любым из вышеизложенного, или фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вышеизложенного.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложен способ предупреждения или лечения заболевания или расстройства, причем  
25 указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к нектину-4 в соответствии с любым из вышеизложенного или молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вышеизложенного, или конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеизложенного, или фармацевтической композиции в  
30 соответствии с любым из вышеизложенного. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство предпочтительно является опухолью, аутоиммунным заболеванием или инфекционным заболеванием; в некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство является заболеванием или расстройством, ассоциированным с нектином-4.

35 Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против нектина-4, конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с любым из вышеизложенного, а также один или несколько фармацевтически приемлемых

вспомогательных веществ, разбавителей или носителей. В некоторых вариантах осуществления разовая доза фармацевтической композиции составляет 0,1 мг-3000 мг или 1 мг-1000 мг антитела против нектина-4, описанного выше, или конъюгата антитело-лекарственное средство, описанного выше.

5 Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено применение конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли, или содержащей их фармацевтической композиции в соответствии с любым из вышеизложенного, в качестве лекарственного средства.

10 Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено применение конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли, или содержащей их фармацевтической композиции, в соответствии с любым из вышеизложенного, для получения лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, опосредованного нектином-4; в некоторых вариантах осуществления опосредованное нектином-4 заболевание или расстройство представляет собой рак с  
15 высокой, умеренной или низкой экспрессией нектина-4.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено применение конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли, или содержащей их фармацевтической композиции, в соответствии с любым из вышеизложенного, для получения лекарственного средства для лечения или  
20 предупреждения опухоли или рака; в некоторых вариантах осуществления опухоль или рак выбраны из группы, состоящей из рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака пищевода, немелкоклеточного рака легкого, опухолей гортани, опухолей глотки, опухолей полости рта, рака желудка, рака яичников, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака головы и шеи,  
25 плоскоклеточного рака и меланомы.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения и/или предупреждения опухоли, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной дозы конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли, или содержащей их фармацевтической композиции,  
30 в соответствии с любым из вышеизложенного; в некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рак, ассоциированный с высоким уровнем экспрессии нектина-4, рак, ассоциированный с умеренным уровнем экспрессии нектина-4, или рак, ассоциированный с низким уровнем экспрессии нектина-4.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения также предложен способ  
35 лечения или предупреждения опухоли или рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной дозы конъюгата антитело-лекарство или его фармацевтически приемлемой соли, или содержащей их фармацевтической композиции, в соответствии с любым из вышеизложенного; в некоторых вариантах

осуществления опухоль или рак выбраны из группы, состоящей из рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака пищевода, немелкоклеточного рака легкого, опухолей гортани, опухолей глотки, опухолей полости рта, рака желудка, рака яичников, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака головы и шеи, плоскоклеточного рака и меланомы.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения дополнительно предложено антитело против нектина-4 или его конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии с любым из вышеизложенного в качестве лекарственного средства, а в некоторых вариантах осуществления - в качестве лекарственного средства для лечения рака или опухоли, более предпочтительно в качестве лекарственного средства для лечения рака, опосредованного нектином-4.

Активное соединение может быть приготовлено в форме, пригодной для введения любым подходящим способом. Активное соединение может находиться в форме стандартной дозы или в форме разовой дозы, которую субъекты могут вводить самостоятельно. Стандартная доза соединения или композиции настоящего изобретения может находиться в форме таблетки, капсулы, облатки, флакона, порошка, гранулы, пастилки, суппозитория, регенерирующего порошка или жидкого препарата.

Доза соединения или композиции, используемых в способе лечения, описанном в настоящем документе, как правило варьируется в зависимости от тяжести заболевания, массы тела субъекта и относительной эффективности соединения. Однако, как правило, подходящая стандартная доза может составлять 0,1-1000 мг.

Фармацевтическая композиция настоящего по настоящему изобретению может содержать, в дополнение к активному соединению, одно или несколько вспомогательных веществ, выбранных из группы, состоящей из наполнителя, разбавителя, связующего, смачивающего агента, разрыхлителя, наполнителя и тому подобного. В зависимости от способа введения композиция может содержать от 0,1 масс.% до 99 масс.% активного соединения.

Антитело против нектина-4, предложенное в соответствии с настоящим изобретением, обладает хорошей аффинностью к антигену клеточной поверхности и хорошей эндоцитозной эффективностью; конъюгат антитело против нектина-4-лекарственное средство, предложенный в настоящем документе, обладает очень высокой эффективностью при ингибировании опухолей, а также обладает улучшенной эффективностью и пониженными токсическими и побочными эффектами у животных.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На фиг. 1 показано связывание антитела по настоящему изобретению с клетками Нектин 4-СНОК1.

На фиг. 2 показано связывание антитела по настоящему изобретению с клетками T47D.

На фиг. 3 показано связывание антитела по настоящему изобретению с клетками MDA-MB-468.

5 На фиг. 4 показана эндоцитозная активность антитела по настоящему изобретению в тесте DT3C.

На фиг. 5A показана эндоцитозная активность антитела по настоящему изобретению (20 нМ) в клетках Нектин 4-CHOК1 в тесте pHrodo.

10 На фиг. 5B показана эндоцитозная активность антитела по настоящему изобретению (5 нМ) в клетках Нектин 4-CHOК1 в тесте pHrodo.

На фиг. 6 показана эффективность образцов ADC по настоящему изобретению на ксенотрансплантатных опухолях у мышей, несущих опухоль T47D.

На фиг. 7 показана фармакокинетика образца ADC по настоящему изобретению у крыс Нектин 4 F344 RG.

15

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Термины

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в той области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, также могут быть использованы для реализации или тестирования настоящего изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны в настоящем документе. В описании и формуле настоящего изобретения используются следующие термины в соответствии с приведенными ниже определениями.

Когда в настоящем изобретении используется торговое наименование, оно должно включать в себя состав коммерческого продукта под торговым наименованием, а также лекарственное средство и активный лекарственный компонент коммерческого продукта под торговым наименованием.

30 Если не указано иное, термины, используемые в описании и формуле изобретения, имеют следующие значения.

Трехбуквенные и однобуквенные коды аминокислот, используемые в настоящем документе, описаны в *J. biol. chem*, 243, p3558 (1968).

35 Термин «аминокислота» относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и аминокислотным имитаторам, которые функционируют по аналогии с природными аминокислотами. Встречающиеся в природе аминокислоты - это аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые позже модифицировались, например, гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутаминовая кислота и

О-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют по существу идентичную химическую структуру (т.е.  $\alpha$  углерод, который связывается с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой) с природными аминокислотами, например, гомосерин, норлейцин, сульфоксид метионина и метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированную R-группу (например, норлейцин) или модифицированный пептидный скелет, но сохраняют по существу идентичную химическую структуру с природными аминокислотами. Имитаторы аминокислот означают химические соединения, которые имеют структуру, отличную от общей химической структуры аминокислот, но функционируют по аналогии с природными аминокислотами.

Термин «антитело» используется в данном документе в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая, помимо прочего, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и полноразмерные антитела, а также фрагменты антител (или антигенсвязывающие фрагменты, или антигенсвязывающие группировки) при условии, что они проявляют требуемую антигенсвязывающую активность.

«Нативное антитело» относится к молекуле иммуноглобулина природного происхождения. Например, нативное антитело IgG представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин массой около 150 000 дальтон, состоящий из двух одинаковых легких цепей и двух одинаковых тяжелых цепей, соединенных дисульфидной связью. От N-конца до C-конца каждая тяжелая цепь имеет одну переменную область (VH), также известную как переменный тяжелый домен или переменный домен тяжелой цепи, за которым следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогичным образом, от N-конца до C-конца, каждая легкая цепь имеет одну переменную область (VL), также известную как переменный легкий домен или переменный домен легкой цепи, за которым следует один константный легкий домен (также известный как константная область легкой цепи, CL).

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «целое антитело» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к антителу, имеющему по существу структуру, аналогичную структуре нативного антитела, или чьи тяжелые цепи содержат Fc-область, как определено в настоящем документе.

«Выделенное» антитело - это антитело, которое было отделено от компонентов его естественной среды. В настоящем описании в некоторых вариантах осуществления антитело может быть очищено до чистоты более 90% или чистоты 99%. В некоторых вариантах осуществления антитело очищают и анализируют такими способами, как электрофорез (например, SDS-PAGE, изоэлектрофокусирование (IEF), капиллярный электрофорез) или хроматография (например, ионообменная или обращенно-фазовая ВЭЖХ).

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену в тяжелой и/или легкой цепях антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Каждый из VH и VL нативного антитела IgG содержит четыре консервативных каркасных области (FR) и три определяющих комплементарность области (CDR). Термин «область, определяющая комплементарность» или «CDR» относится к области в вариабельном домене, которая главным образом способствует связыванию антигена; «каркас» или «FR» относится к остаткам вариабельного домена, отличным от CDR остатков в вариабельных доменах. VH содержит 3 области CDR: HCDR1, HCDR2 и HCDR3; VL содержит 3 области CDR: LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Одной VH или VL может быть достаточно для обеспечения антигенсвязывающей специфичности.

Границы аминокислотных последовательностей CDR можно определить с помощью множества хорошо известных схем, например, схемы нумерации «Кабат» (см. Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5<sup>th</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), схема нумерации «Chothia», схема нумерации «ABM», схема «контактной» нумерации (см. Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001) и схему нумерации ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003); Front Immunol. 2018, 16 октября; 9: 2278) и тому подобное. Соответствующие связи между различными схемами нумерации хорошо известны специалистам в данной области техники и являются типовыми, как показано в Таблице 1 ниже.

Таблица 1. Связь между схемами нумерации CDR

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Контактная
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

Термин «легкая цепь» включает домен VL вариабельной области и домен CL константной области. VL находится на амино-конце легкой цепи. Легкие цепи включают цепи κ и λ.

Термин «тяжелая цепь» включает домен VH вариабельной области и три домена константной области CH1, CH2 и CH3. VH находится на амино-конце тяжелой цепи, а CH-домены находятся на карбокси-конце, причем CH3 расположен ближе всего к карбокси-концу полипептида. Тяжелая цепь может относиться к любому изотипу, включая IgG

(включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

Термин «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит фрагмент интактного антитела, который связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Фрагменты антител включают, среди прочего, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, однодоменные антитела, одноцепочечные Fab (scFab), диатела, линейные антитела, одноцепочечные антитела (например, scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин «область Fc» или «кристаллизирующийся фрагмент иммуноглобулина» используется для определения C-концевой области тяжелой цепи антитела, включая области Fc с нативной последовательностью и модифицированные Fc-области. В некоторых вариантах осуществления Fc-область тяжелой цепи IgG человека определяется как простирающаяся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до ее карбоксильного конца. Границы Fc-области тяжелой цепи антитела также могут варьироваться, например, за счет удаления C-концевого лизина Fc-области (остаток 447 по схеме EU-нумерации) или удаления C-концевого глицина и лизина Fc-области (остатки 446 и 447 по схеме EU-нумерации).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления композиция интактных антител может содержать популяции антител, в которых удалены все остатки K447 и/или G446 + K447. В некоторых вариантах осуществления композиция интактных антител может содержать популяции антител без остатка K447 и/или с удаленными остатками G446 + K447. В некоторых вариантах осуществления композиция интактных антител включает популяции антител, содержащие смесь антител с остатками K447 и без них, и/или с остатками G446 + K447 и без них. Подходящие Fc-области с нативной последовательностью для описанных в данном документе антител включают человеческие IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 и IgG4. Если в данном документе не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует схеме EU-нумерации, также известной как EU-индекс, как описано Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Термин «химерное» антитело относится к антителу, в котором часть тяжелых и/или легких цепей антитела происходит из определенного источника или вида, тогда как остальная часть тяжелых и/или легких цепей происходит из другого источника или вида.

Термин «гуманизированное» антитело относится к антителу, которое сохраняет реактивность нечеловеческого антитела, обладая при этом низкой иммуногенностью для человека. Например, этого можно достичь путем сохранения нечеловеческих CDR-областей и замены оставшейся части антитела его человеческими эквивалентами (т.е. константными областями и частью каркасной области переменных областей).

Термин «человеческое антитело» относится к антителу, в котором переменная и

константная области представляют собой человеческие последовательности. Данный термин охватывает антитела, которые получены из человеческих генов, но содержат, например, последовательности, которые были изменены, например, для снижения возможной иммуногенности, повышения аффинности, устранения цистеинов, которые могут быть причиной нежелательного фолдинга, или создания сайтов гликозилирования. Данный термин охватывает антитела, рекомбинантно продуцируемые в клетках нечеловеческого происхождения, которые могут обеспечивать гликозилирование, не характерное для клеток человека. Данный термин также охватывает антитела, которые были культивированы у трансгенных мышей, которые содержат некоторые или все локусы тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина человека. Понятие человеческого антитела конкретно исключает гуманизированные антитела, содержащие нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

Термин «антитело с созревшей аффинностью» относится к антителу с одним или несколькими изменениями в одной или нескольких CDR, которые приводят к улучшению аффинности антитела к антигенам по сравнению с исходным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело с созревшей аффинностью имеет наномолярную или даже пикомолярную аффинность к целевому антигену. Антитела с созревшей аффинностью можно получить с использованием способов, известных в данной области техники. Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) описывает созревание аффинности посредством перетасовки доменов VH и VL. В следующих документах описан случайный мутагенез остатков CDR и/или остатков каркасной области: Barbas et al., *PNAS*, 91:3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al., *J.Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J.Immunol.* 154 (7):3310-9 (1995) and Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Термин «моноклональное антитело» относится к популяции по существу гомогенных антител, то есть аминокислотные последовательности молекул антител, входящих в популяцию, идентичны, за исключением небольшого количества природных мутаций, которые могут существовать. Напротив, препараты поликлональных антител обычно содержат множество разных антител, имеющих разные аминокислотные последовательности в своих переменных доменах, которые как правило обладают специфичностью в отношении разных эпитопов. «Моноклональный» относится к характеристикам антитела, полученного из по существу гомогенной популяции антител, и данный термин не должен истолковываться как требующий получения антитела каким-либо конкретным методом.

Например, моноклональные антитела можно получить методом гибридом, описанным Kohler et al., (1975) *Nature* 256:495, или методами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). Или «моноклональные антитела» можно выделить из библиотек фаговых антител с использованием методик, описанных в Clackson et al.,

(1991) *Nature* 352: 624-628 и в Marks et al., (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597. Или см. Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731, или «моноклональные антитела» можно получить с использованием способов, в которых используются трансгенные животные, содержащие все или часть локусов иммуноглобулинов человека.

5            Термин «антиген» относится к молекуле или молекулярному фрагменту, который способен избирательно связываться антителом и может быть использован в организме животного для продукции антитела, способного связываться с антигеном. Антиген может иметь один или несколько эпитопов, способных взаимодействовать с разными антителами.

10           Термин «эпитоп» относится к области или участку антигена, который способен специфически связываться с антителом. Эпитопы могут образовываться из непрерывных последовательностей аминокислот (линейный эпитоп) или состоять из несмежных аминокислот (конформационный эпитоп), например, сближающихся в пространстве вследствие фолдинга антигена (т.е. третичного фолдинга белковоподобного антигена).  
15           Разница между конформационным эпитопом и линейным эпитопом заключается в том, что в присутствии денатурирующих растворителей теряется связывание антитела с конформационным эпитопом. Эпитоп содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

20           Скрининг антител, которые связываются с определенными эпитопами (т.е. те, которые связываются с идентичными эпитопами), может быть выполнен с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, включая, среди прочего, аланиновое сканирование, пептидный блоттинг (см. *Meth. Mol. Biol.* 248 (2004) 443-463), анализ пептидного расщепления, удаление эпитопов, экстракцию эпитопов,  
25           химическую модификацию антигена (см. *Prot. Sci.* 9 (2000) 487-496) и перекрестное блокирование (см. "Antibodies", Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)).

              «Антитело, которое связывается с тем же самым эпитопом эпитопом», что и эталонное антитело, или «антитело, которое конкурирует за связывание» с эталонным  
30           антителом, относится к антителу, которое блокирует связывание эталонного антитела с антигеном на 50% или более, или к антителу, связывание которого с антигеном блокируется на 50% или более эталонным антителом в конкурентном анализе. Например, чтобы определить, связывается ли исследуемое антитело с тем же самым эпитопом, что и эталонное антитело, эталонному антителу дают возможность связываться с антигеном  
35           в условиях насыщения. После удаления избытка эталонного антитела оценивают способность исследуемого антитела связываться с антигеном. Чтобы подтвердить, связывается ли исследуемое антитело с тем же самым эпитопом или связывание затруднено по стерическим причинам, можно использовать общепринятые

экспериментальные исследования (например, анализ пептидных мутаций и анализ связывания с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники). Этот анализ следует  
5 проводить в две стадии, т.е. при этом оба антитела являются насыщающими антителами. Если в обоих случаях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с антигеном, то можно сделать вывод, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с антигеном.

В некоторых вариантах осуществления считается, что два антитела связываются с  
10 одним и тем же эпитопом или перекрывающимся эпитопом, если 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 90% или даже на 99% или более, согласно измерениям, проведенным при анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 50 (1990) 1495-1502).

В некоторых вариантах осуществления считается, что два антитела связываются с  
15 одним и тем же эпитопом, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или элиминируют связывание одного антитела, снижают или элиминируют связывание другого антитела. Считается, что два антитела имеют «перекрывающиеся эпитопы», если только некоторые из мутаций снижают или  
20 элиминируют связывание другого антитела.

Термин «аффинность» относится к общей силе нековалентного взаимодействия между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в настоящем документе термин «аффинность связывания» относится к внутренней аффинности связывания,  
25 которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее лиганду Y как правило можно выразить через равновесную константу диссоциации (KD). Аффинность можно определить общепринятыми способами, известными в данной области техники, включая описанные в данном документе.

В настоящем документе термин «константа ассоциации» или «ka» относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин «константа диссоциации» или «kd» относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин «KD» относится к равновесной константе диссоциации, которую получают из отношения kd к ka (т.е. kd/ka) и обозначают через  
35 молярную концентрацию (M). Значение KD антитела можно определить с использованием способов, хорошо известных в данной области. Например, поверхностный плазмонный резонанс определяют с использованием биосенсорной системы, такой как система, или аффинность в растворе определяют титрованием при равновесии в растворе (SET).

Термин «специфически связывается», «специфическое связывание» или «связывается» относится к антителу, связывающемуся с антигеном или эпитопом антигена с большей аффинностью, чем с другими антигенами или эпитопами. Как правило, антитело связывается с антигеном или эпитопом антигена с равновесной константой диссоциации (KD), составляющей примерно  $1 \times 10^{-7}$  М или меньше (например, примерно  $1 \times 10^{-8}$  М или меньше, примерно  $1 \times 10^{-9}$  М или меньше). В некоторых вариантах осуществления KD связывания антитела с антигеном составляет 10% или менее (например, 1%) от KD связывания антитела с неспецифическим антигеном (например, БСА или казеином). KD можно определить с использованием известных в данной области способов, например, с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса BIACORE®. Однако антитело, которое специфически связывается с антигеном или эпитопом антигена, может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например с соответствующими антигенами других видов (гомологичных), таких как люди или обезьяны, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, суно), *Pan troglodytes* (шимпанзе, шамп.) или *Callithrix jacchus* (мартышка обыкновенная, мартышка).

Термины «антитело против нектина-4» и «антитело, которое связывается с нектином-4» относятся к антителу, которое способно связываться с нектином-4 с достаточной аффинностью. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с нектином-4, имеет равновесную константу диссоциации (KD) <примерно 1 мкМ, < примерно 100 нМ, <примерно 10 нМ, <примерно 1 нМ, <примерно 0,1 нМ, < примерно 0,01 нМ или < примерно 0,001 нМ (например,  $10^{-8}$  М или менее, например, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-9}$  М, например,  $10^{-9}$  М или менее). В некоторых вариантах осуществления антитело против нектина-4 связывается с эпитопом консервативного нектина-4 у нектина-4 разных видов.

Термин «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, естественных киллерах (NK-клетках), нейтрофилах и макрофагах), позволяет данным цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с клетками-мишенями, несущими антиген, и затем уничтожать данные клетки-мишени цитотоксинами. Антитела «вооружают» цитотоксические клетки и необходимы для такого уничтожения. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках кратко изложена в таблице 3 на стр. 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol*, 9:457-92 (1991). Для оценки активности ADCC в отношении молекулы-мишени может быть проведен ADCC анализ *in vitro*, такой как описан в патенте США No 5500362 или 5821337. Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные

киллеры (NK). В качестве альтернативы активность ADCC в отношении молекулы-мишени может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели (например, описанной в Clynes et al. (США) 95:652-656 (1998)).

5 Термин «антителозависимый клеточный фагоцитоз» (ADCP) относится к механизму, с помощью которого клетки-мишени, покрытые антителами, элиминируются путем интернализации фагоцитарных клеток, таких как макрофаги или дендритные клетки.

10 Термин «комплемент-зависимая цитотоксичность» или «CDC» относится к механизму индуцирования клеточной гибели, при котором эффекторный домен Fc связывающего мишень антитела связывается с компонентом комплемента C1q и активирует его, а C1q затем активирует каскад комплемента, что приводит к гибели клетки-мишени. Активация комплемента также может привести к отложению компонентов комплемента на поверхности клеток-мишеней, которые стимулируют CDC, связываясь с рецепторами комплемента на лейкоцитах (например, CR3).

15 Термин «нуклеиновая кислота» используется в контексте данного документа взаимозаменяемо с термином «полинуклеотид» и относится к дезоксирибонуклеотиду или рибонуклеотиду и их полимеру либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. Данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки или связи основной цепи, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и неприродными, обладают свойствами связывания, аналогичными эталонной нуклеиновой кислоте, и метаболизируются способом, аналогичным эталонному нуклеотиду. Примеры таких аналогов включают, среди прочего, фосфоротиоат, фосфорамидат, метилфосфонат, хиральный метилфосфонат, 2-О-метилрибонуклеотид и пептид-нуклеиновую кислоту (ПНК). «Выделенная» нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонентов ее естественной среды. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетке, которая обычно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, однако молекула нуклеиновой кислоты присутствует внехромосомно или в хромосомном положении, отличном от ее естественного хромосомного положения. «Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против нектин-4» относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим тяжелые и легкие цепи антитела (или их фрагменты).

35 Если не указано иное, то подразумевается, что конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также включает в себя ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, как подробно описано ниже, замены вырожденных кодонов могут быть получены путем генерации последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких

выбранных (или всех) кодонов заменяется смесью оснований и/или остатками дезоксинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*19:5081, 1991; Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*8:91-98, 1994).

5 Термины «полипептид» и «белок» используются в контексте данного документа  
взаимозаменяемо и относятся к полимеру из аминокислотных остатков. Данные термины  
применяются к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько  
аминокислотных остатков представляют собой синтезированные химические аналоги  
соответствующих встречающихся в природе аминокислот, а также к встречающимся в  
10 природе полимерам аминокислот и полимерам аминокислот неприродного  
происхождения.

Термин «голое антитело» относится к антителу, которое не конъюгировано с  
гетерологичным модулем (например, цитотоксическим модулем) или радиоактивной  
меткой. Голое антитело может присутствовать в фармацевтическом составе.

15 Термин «идентичность», «идентичность последовательностей» или «идентичность  
аминокислотных последовательностей» относится к степени (в процентах), в которой  
аминокислоты/нуклеиновые кислоты двух последовательностей идентичны в  
эквивалентных положениях, когда две последовательности оптимально выровнены, при  
этом гэпы вводятся по мере необходимости для достижения максимального процента  
идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен как  
20 части идентичности последовательностей. Для определения процентной идентичности  
последовательностей можно достичь выравнивания с использованием способов, хорошо  
известных в данной области техники, таких как BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или  
Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить  
параметры, подходящие для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы,  
25 необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине  
выравниваемых последовательностей.

Термин «консервативно модифицированный вариант» или «консервативная  
замена» относится к заменам аминокислот в белке другими аминокислотами, имеющими  
схожие характеристики (например, заряд, размер боковой цепи,  
30 гидрофобность/гидрофильность, конформацию основной цепи и жесткость), такие, что  
изменения часто могут быть внесены без изменения биологической активности белка.  
Специалисты в данной области понимают, что, как правило, одиночные аминокислотные  
замены в несущественных областях полипептида существенно не изменяют  
биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the*  
35 *Gene*, The Benjamin/ Cummings Pub. Co., стр. 224 (4-е изд.)). Термин «консервативно  
модифицированный вариант», применительно к последовательностям нуклеиновой  
кислоты, относится к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по  
существу идентичные аминокислотные последовательности, или где нуклеиновая

кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к по существу идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода любой заданный белок кодируется несколькими функционально идентичными нуклеиновыми кислотами. Например, кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, где аланин кодируется кодоном, этот кодон можно заменить на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновых кислот представляют собой «молчащие вариации», которые представляют собой один из видов консервативно модифицированных вариаций. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, также описывает все возможные молчащие вариации нуклеиновой кислоты. Специалисту понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован для получения функционально идентичной молекулы. Таким образом, подразумевается, что каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, присутствует в каждой описанной последовательности.

Термин «экспрессионный вектор» или «экспрессионная конструкция» относится к вектору, который применяется для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая направляет и/или контролирует (вместе с клеткой-хозяином) экспрессию одного или нескольких гетерологичных кодирующих элементов, функционально с ним связанных. Экспрессионные конструкции могут включать, помимо прочего, последовательности, которые влияют на или контролируют транскрипцию и трансляцию, а также влияют на сплайсинг РНК кодирующей области, функционально связанной с ней, в присутствии интрона.

Используемый в данном документе термин «функционально связанный» означает, что компоненты, к которым применяется этот термин, находятся во взаимосвязи, которая позволяет им выполнять присущие им функции в подходящих условиях. Например, контрольную последовательность в векторе, которая «функционально связана» с кодирующей белок последовательностью, лигируют с ней так, чтобы экспрессия кодирующей белок последовательности достигалась в условиях, совместимых с транскрипционной активностью контрольных последовательностей.

Термины «клетка-хозяин», «клеточная линия-хозяин» и «культура клетки-хозяина» используются как взаимозаменяемые и относятся к клеткам, в которые были введены экзогенные нуклеиновые кислоты, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первичные трансформированные клетки и потомство, полученное из них, вне зависимости от количества пассажей. Потомство может отличаться от родительских клеток по содержанию нуклеиновых кислот и может содержать мутации. Мутантное

потомство, обладающее той же функцией или биологической активностью, что и клетки, подвергнутые скринингу или отобранные из группы, состоящей из первоначально трансформированных клеток, включены в объем настоящего изобретения. Клетки-хозяева включают в себя прокариотические и эукариотические клетки-хозяева, при этом эукариотические клетки-хозяева включают, помимо прочего, клетки млекопитающих, клеточные линии насекомых, клетки растений и клетки грибов. Типичными клетками-хозяевами являются: клетки яичника китайского хомяка (CHO), NSO, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почек новорожденного хомяка (BHK), клетки почек обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3 и клетки HEK-293, *Pichiapastoris*, *Pichia finlandica*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*.

В настоящей заявке термины «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» являются взаимозаменяемыми и включают в себя потомство такой клетки. Таким образом, слова «трансформант» и «трансформированная клетка» включают в себя первичную клетку-субъект и культуры, полученные из нее, независимо числа пассажей. Также следует понимать, что не все потомство имеет абсолютно идентичное содержание ДНК вследствие преднамеренных или непреднамеренных мутаций. Вариантное потомство, обладающее той же функцией или биологической активностью, что и исходная трансформированная клетка, из которой оно было отобрано, также включено.

Способы получения и очистки антител и антигенсвязывающих фрагментов хорошо известны в данной области техники, например, те, которые описаны в главах 5-8 и 15 книги «Антитела: лабораторное руководство», издательство «Cold Spring Harbor Press». Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, генетически модифицированы таким образом, чтобы содержать один или несколько дополнительных человеческих FR в нечеловеческих CDR. Последовательности зародышевой линии человека FR можно получить на веб-сайте <http://imgt.cines.fr> ImMunoGeneTics (IMGT) или из журнала иммуноглобулинов, 2001 ISBN012441351, путем сравнения базы данных генов зародышевой линии вариабельной области человеческих антител по IMGT с программным обеспечением MOE.

Сконструированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может быть получено и очищено общепринятыми способами. Например, последовательности κДНК, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть клонированы и рекомбинированы в экспрессионный вектор. Векторы экспрессии рекомбинантных иммуноглобулинов могут стабильно трансфицироваться в клетки-хозяева. В качестве более рекомендуемого уровня техники системы экспрессии млекопитающих будут приводить к гликозилированию антитела, особенно на N-концевом сайте Fc-области. Стабильные клоны получают путем экспрессии антитела, которое специфически связывается с нектином-4 человека. Положительные клоны размножаются в среде в

биореакторе для производства антител. Культуральную среду с секретлируемым антителом можно очистить общепринятыми методиками, например, с использованием колонки A или G Sepharose FF. Неспецифически связанные фракции смывают. Связанное антитело элюируют способом pH градиента, фрагменты антител выявляют с помощью SDS-PAGE и собирают. Антитело можно фильтровать и концентрировать общепринятыми способами. Растворимые смеси и полимеры также можно удалить общепринятыми способами, такими как молекулярные сита и ионный обмен. Полученный продукт необходимо сразу же заморозить, например, при  $-70^{\circ}\text{C}$ , или лиофилизировать.

«Выделенный» относится к очищенному состоянию и в данном случае означает, что обозначенная молекула по существу свободна от других биомолекул, таких как нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы или другие материалы (такие как клеточный мусор и ростовая среда). Как правило, термин «выделенный» не означает полное отсутствие таких материалов или отсутствие воды, буферов или солей, если только они не присутствуют в количествах, которые будут в значительной степени мешать экспериментальному или терапевтическому использованию соединений, описанных в данном документе

Термин «лекарственное средство» относится к химическому веществу, которое может изменять или устанавливать физиологию и патологическое состояние организма и может использоваться для профилактики, диагностики и лечения заболеваний. Лекарственное средство включает цитотоксическое лекарственное средство. Четкой границы между лекарственным средством и токсическим веществом нет. Под токсическим веществом понимается химическое вещество, оказывающее токсическое воздействие на организмы и способное нанести вред здоровью человека даже в малых дозах. Любое лекарство в больших дозах может вызывать токсические реакции.

Цитотоксическое лекарственное средство относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функционирование клеток и/или вызывает гибель или разрушение клеток. Цитотоксическое лекарственное средство в принципе способно уничтожать опухолевые клетки при достаточно высокой концентрации; однако из-за отсутствия специфичности цитотоксическое лекарственное средство может вызывать апоптоз нормальных клеток, одновременно уничтожая опухолевые клетки, что приводит к серьезным побочным эффектам. Цитотоксический препарат включает токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, радиоизотопы (например,  $\text{At}^{211}$ ,  $\text{I}^{131}$ ,  $\text{I}^{125}$ ,  $\text{Y}^{90}$ ,  $\text{Re}^{186}$ ,  $\text{Re}^{188}$ ,  $\text{Sm}^{153}$ ,  $\text{Bi}^{212}$ ,  $\text{P}^{32}$  и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические лекарственные средства, антибиотики и нуклеолитические ферменты.

Термин «алкил» относится к насыщенной алифатической углеводородной группе, которая представляет собой линейную или разветвленную группу, содержащую от 1 до 20

атомов углерода, предпочтительно алкил, содержащий от 1 до 12 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12) атомов углерода и более предпочтительно алкил, содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Неограничивающие примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-этил-2-метилпропил, 1,1,2-триметилпропил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-этилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил, н-гептил, 2-метилгексил, 3-метилгексил, 4-метилгексил, 5-метилгексил, 2,3-диметилпентил, 2,4-диметилпентил, 2,2-диметилпентил, 3,3-диметилпентил, 2-этилпентил, 3-этилпентил, н-октил, 2,3-диметилгексил, 2,4-диметилгексил, 2,5-диметилгексил, 2,2-диметилгексил, 3,3-диметилгексил, 4,4-диметилгексил, 2-этилгексил, 3-этилгексил, 4-этилгексил, 2-метил-2-этилпентил, 2-метил-3-этилпентил, н-нонил, 2-метил-2-этилгексил, 2-метил-3-этилгексил, 2,2-диэтилпентил, н-децил, 3,3-диэтилгексил, 2,2-диэтилгексил и их различные структурные изомеры, и т.п.

Более предпочтительным является низший алкил, содержащий от 1 до 6 атомов углерода, и неограничивающие примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-этил-2-метилпропил, 1,1,2-триметилпропил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-этилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил и тому подобное. Алкил может быть замещенным или незамещенным. Когда он замещен, заместитель может быть замещен в любой доступной точке присоединения, при этом заместитель предпочтительно представляет собой один или несколько заместителей, независимо возможно выбранных из группы, состоящей из атома дейтерия (D), галогена, алкила, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклилокси, гидрокси, гидроксиалкила, циано, amino, нитро, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила.

Термин «алкокси» относится к фрагменту -O-(алкил), где алкил имеет значения, определенные выше. Неограничивающие примеры алкокси включают метокси, этокси, пропокси и бутокси. Алкокси может быть возможно замещенным или незамещенным. Когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой одну или несколько групп, независимо выбранных из группы, состоящей из атома D, галогена, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклилокси, гидрокси, гидроксиалкила, циано, amino, нитро, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила.

Термин «алкилен» относится к насыщенной линейной или разветвленной алифатической углеводородной группе, которая представляет собой остаток, полученный из исходного алкана путем удаления двух атомов водорода от одного и того же атома углерода или двух разных атомов углерода. Это линейная или разветвленная группа,

содержащая от 1 до 20 атомов углерода, предпочтительно алкилен, содержащий от 1 до 12 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12) атомов углерода, и более предпочтительно алкилен, содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Неограничивающие примеры алкилена включают, помимо прочего, метилен (-CH<sub>2</sub>-), 1,1-этилен (-CH(CH<sub>3</sub>)-), 1,2-этилен(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,1-пропилен (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-), 1,2-пропилен (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-), 1,3-пропилен (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,4-бутилен (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), и т.п. Алкилен может быть замещенным или незамещенным. Когда он замещен, заместитель может быть присоединен в любой доступной точке присоединения, при этом заместитель предпочтительно представляет собой один или несколько заместителей, независимо  
5  
10 возможно выбранных из группы, состоящей из алкенила, алкинила, алкокси, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклилокси, алкилтио, алкиламино, галогена, сульфгидрила, гидроксид, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио, гетероциклоалкилтио и оксо.

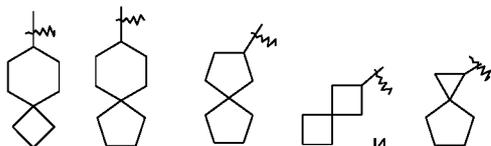
Термин «алкенил» относится к алкильному соединению, имеющему по меньшей мере одну двойную углерод-углеродную связь в молекуле, при этом алкил имеет значения, определенные выше. Алкенил предпочтительно содержит от 2 до 12 (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12) атомов углерода и более предпочтительно содержит от 2 до 6 атомов углерода. Алкенил может быть замещенным или незамещенным. Когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой  
15  
20 одну или несколько групп, независимо выбранных из группы, состоящей из алкокси, галогена, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклилокси, гидроксид, гидроксиалкила, циано, амино, нитро, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила.

Термин «алкинил» относится к алкильному соединению, имеющему по меньшей мере одну тройную углерод-углеродную связь в молекуле, при этом алкил имеет значения, определенные выше. Алкинил предпочтительно содержит от 2 до 12 (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12) атомов углерода и более предпочтительно содержит от 2 до 6 атомов углерода. Алкинил может быть замещенным или незамещенным. Когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой  
25  
30 одну или несколько групп, независимо выбранных из группы, состоящей из алкила, алкокси, галогена, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклилокси, гидроксид, гидроксиалкила, циано, амино, нитро, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила.

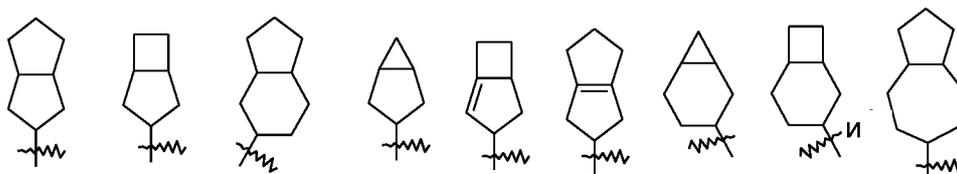
Термин «циклоалкил» относится к насыщенному или частично ненасыщенному моноциклическому или полициклическому углеводородному заместителю.  
35  
Циклоалкильное кольцо содержит от 3 до 20 атомов углерода, предпочтительно от 3 до 12 (например, от 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12) атомов углерода, более предпочтительно от 3 до 8 атомов углерода, и наиболее предпочтительно от 3 до 6 атомов углерода. Неограничивающие примеры моноциклического циклоалкила включают циклопропил,

циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогексадиенил, циклогептил, циклогептатриенил, циклооктил и тому подобное. Полициклический циклоалкил включает спироциклоалкил, конденсированный циклоалкил и мостиковый циклоалкил.

5 Термин «спироциклоалкил» относится к 5-20-членной полициклической группе, в которой моноциклические кольца имеют общий один атом углерода (называемый спироатомом), при этом спироциклоалкил может содержать одну или несколько двойных связей. Предпочтительно он является 6-14-членным (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14) и более предпочтительно 7-10-членным (например, 7, 8, 9 или 10). В зависимости от количества спироатомов, общих для колец, спироциклоалкил может представлять собой моноспироциклоалкил, биспироциклоалкил или полиспироциклоалкил, предпочтительно моноспироциклоалкил и биспироциклоалкил, и более предпочтительно 3-членный/4-членный, 3-членный/5-членный, 3-членный/6-членный, 4-членный/4-членный, 4-членный/5-членный, 4-членный/6-членный, 5-членный/4-членный, 5-членный/5-членный, 15 5-членный/6-членный, 6-членный/3-членный, 6-членный/4-членный, 6-членный/5-членный и 6-членный/6-членный моноспироциклоалкил. Неограничивающие примеры спироциклоалкила включают:

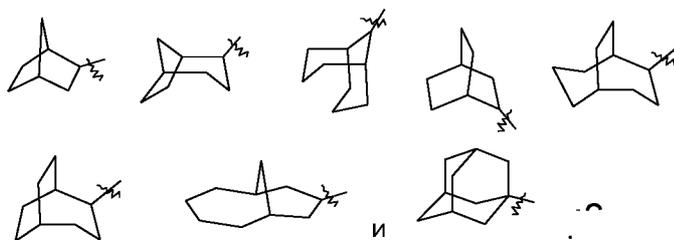


Термин «конденсированный циклоалкил» относится к 5-20-членной полностью углеродной полициклической группе, в которой каждое кольцо имеет общую пару соседних атомов углерода с другими кольцами в системе, причем одно или несколько колец могут содержать одну или несколько двойных связей. Предпочтительно он содержит 6-14 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14) членов и более предпочтительно 7-10 (например, 7, 8, 9 или 10) членов. В зависимости от числа колец в составе конденсированный циклоалкил может представлять собой бициклический, трициклический, тетрациклический или полициклический циклоалкил, предпочтительно бициклический или трициклический циклоалкил, и более предпочтительно 3-членный/4-членный, 3-членный/5-членный, 3-членный/6-членный, 4-членный/4-членный, 4-членный/5-членный, 4-членный/6-членный, 5-членный/4-членный, 5-членный/5-членный, 25 5-членный/6-членный, 6-членный/3-членный, 6-членный/4-членный, 6-членный/5-членный и 6-членный/6-членный бициклический циклоалкил. Неограничивающие примеры конденсированного циклоалкила включают:



Термин «мостиковый циклоалкил» относится к 5-20-членной полностью углеродной полициклической группе, в которой любые два кольца имеют общие два атома углерода, которые не связаны напрямую, и может содержать одну или несколько двойных связей.

- 5 Предпочтительно он является 6-14-членным (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14 членов ) и более предпочтительно 7-10-членным (например, 7, 8, 9 или 10) членов. В зависимости от количества колец в составе, мостиковый циклоалкил может быть бициклическим, трициклическим, тетрациклическим или полициклическим, предпочтительно бициклическим, трициклическим или тетрациклическим, и более
- 10 предпочтительно бициклическим или трициклическим. Неограничивающие примеры мостикового циклоалкила включают:



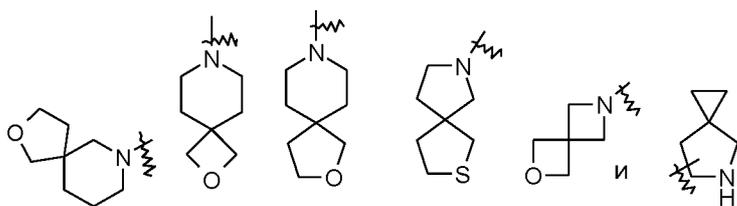
- Циклоалкильное кольцо включает кольца, в которых описанный выше циклоалкил (включая моноциклический, спиро, конденсированный и мостиковый) конденсирован с
- 15 арильным, гетероарильным или гетероциклоалкильным кольцом, где кольцо, присоединенное к исходной структуре, представляет собой циклоалкил. Неограничивающие примеры включают инданил, тетрагидронафтил, бензоциклогептанил и тому подобное, и предпочтительно инданил и тетрагидронафтил.

- Циклоалкил может быть замещенным или незамещенным. Когда он замещен, заместитель может быть замещен в любой доступной точке присоединения, при этом заместитель предпочтительно представляет собой один или несколько заместителей, независимо возможно выбранных из группы, состоящей из галогена, алкила, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклокси, гидрокси, гидроксиалкила, циано, амина, нитро, циклоалкила, гетероциклолила, арила и гетероарила.

- 25 Термин «гетероциклил» относится к насыщенному или частично ненасыщенному моноциклическому или полициклическому заместителю, содержащему от 3 до 20 кольцевых атомов, где один или несколько кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода, серы, S(O) и S(O)<sub>2</sub>, за исключением циклической части -O-O-, -O-S- или -S-S-, а остальные кольцевые атомы
- 30 представляют собой атомы углерода. Предпочтительно он содержит от 3 до 12

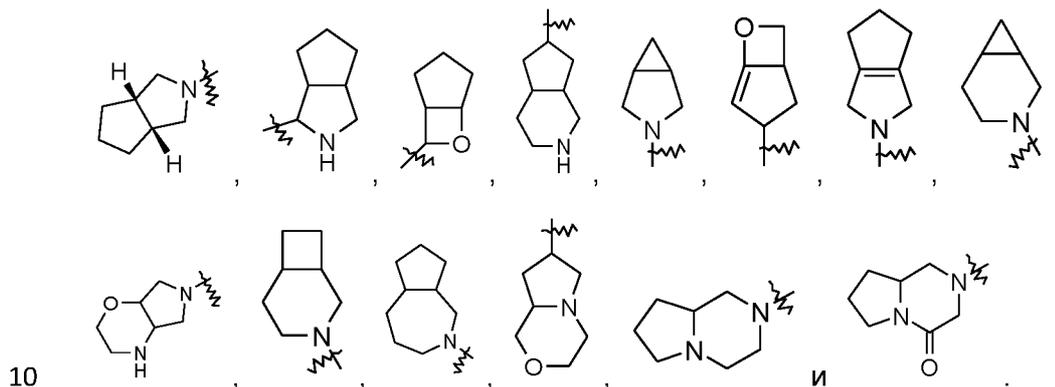
(например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12) кольцевых атомов, из которых от 1 до 4 (например, 1, 2, 3 и 4) являются гетероатомами; более предпочтительно от 3 до 8 (например, 3, 4, 5, 6, 7 и 8) кольцевых атомов, из которых от 1 до 3 (например, 1, 2 и 3) являются гетероатомами; более предпочтительно от 3 до 6 кольцевых атомов, из которых от 1 до 3 являются гетероатомами; наиболее предпочтительно 5 или 6 кольцевых атомов, из которых от 1 до 3 являются гетероатомами. Неограничивающие примеры моноциклического гетероциклила включают пирролидинил, тетрагидропиранил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперидинил, пиперазинил, морфолинил, тиоморфолинил, гомопиперазинил и тому подобное. Полициклический гетероциклил включает спирогетероциклил, конденсированный гетероциклил и мостиковый гетероциклил.

Термин «спирогетероциклил» относится к 5-20-членной полициклической гетероциклильной группе, в которой моноциклические кольца имеют общий один атом (называемый спироатомом), при этом один или несколько кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода, серы, S(O) и S(O)<sub>2</sub>, а остальные кольцевые атомы являются атомами углерода. Он может иметь одну или несколько двойных связей. Предпочтительно он является 6-14-членным и более предпочтительно 7-10-членным (например, 7-членным, 8-членным, 9-членным или 10-членным). В зависимости от числа спироатомов, общих у колец, спирогетероциклил может представлять собой моноспирогетероциклил, биспирогетероциклил или полиспирогетероциклил, предпочтительно моноспирогетероциклил и биспирогетероциклил, и более предпочтительно 4-членный/4-членный, 4-членный/5-членный, 4-членный/6-членный, 5-членный/5-членный, 5-членный/6-членный или 6-членный/6-членный моноспирогетероциклил. Неограничивающие примеры спирогетероциклила включают

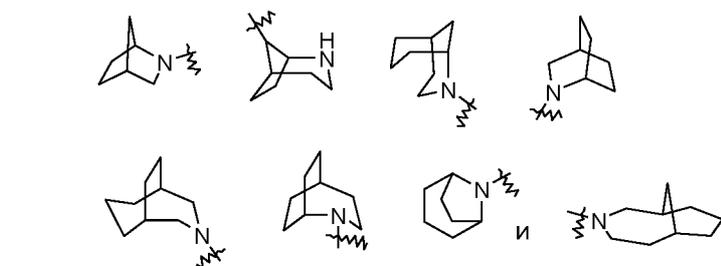


Термин «конденсированный гетероциклил» относится к 5-20-членной полициклической гетероциклильной группе, в которой каждое кольцо имеет общую пару соседних атомов с другими кольцами в системе, причем одно или несколько колец могут содержать одну или несколько двойных связей. В конденсированном гетероциклиле один или несколько кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода, серы, S(O) и S(O)<sub>2</sub>, а другие кольцевые атомы представляют собой атомы углерода. Предпочтительно он является 6-14-членным и более предпочтительно 7-10-членным (например, 7-членным, 8-членным, 9-членным или 10-членным). В зависимости от числа колец в составе, конденсированный гетероциклил

может представлять собой бициклический, трициклический, тетрациклический или полициклический конденсированный гетероцикл, предпочтительно бициклический или трициклический конденсированный гетероцикл и более предпочтительно 3-членный/4-членный, 3-членный/5-членный, 3-членный/6-членный, 4-членный/4-членный, 4-членный/5-членный, 4-членный/6-членный, 5-членный/4-членный, 5-членный/5-членный, 5-членный/6-членный, 6-членный/3-членный, 6-членный/4-членный, 6-членный/5-членный и 6-членный/6-членный бициклический конденсированный гетероцикл. Неограничивающие примеры конденсированного гетероцикла включают:



Термин «мостиковый гетероцикл» относится к 5-14-членной полициклической гетероциклической группе, в которой любые два кольца имеют общие два атома углерода, которые не связаны друг с другом напрямую, причем мостиковый гетероцикл может содержать одну или несколько двойных связей. В мостиковом гетероцикле один или несколько кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода, серы, S(O) и S(O)<sub>2</sub>, а другие кольцевые атомы представляют собой атомы углерода. Предпочтительно он является 6-14-членным и более предпочтительно 7-10-членным (например, 7-членным, 8-членным, 9-членным или 10-членным). В зависимости от количества колец в составе, мостиковый гетероцикл может быть бициклическим, трициклическим, тетрациклическим или полициклическим, предпочтительно бициклическим, трициклическим или тетрациклическим и более предпочтительно бициклическим или трициклическим. Неограничивающие примеры мостикового гетероцикла включают:

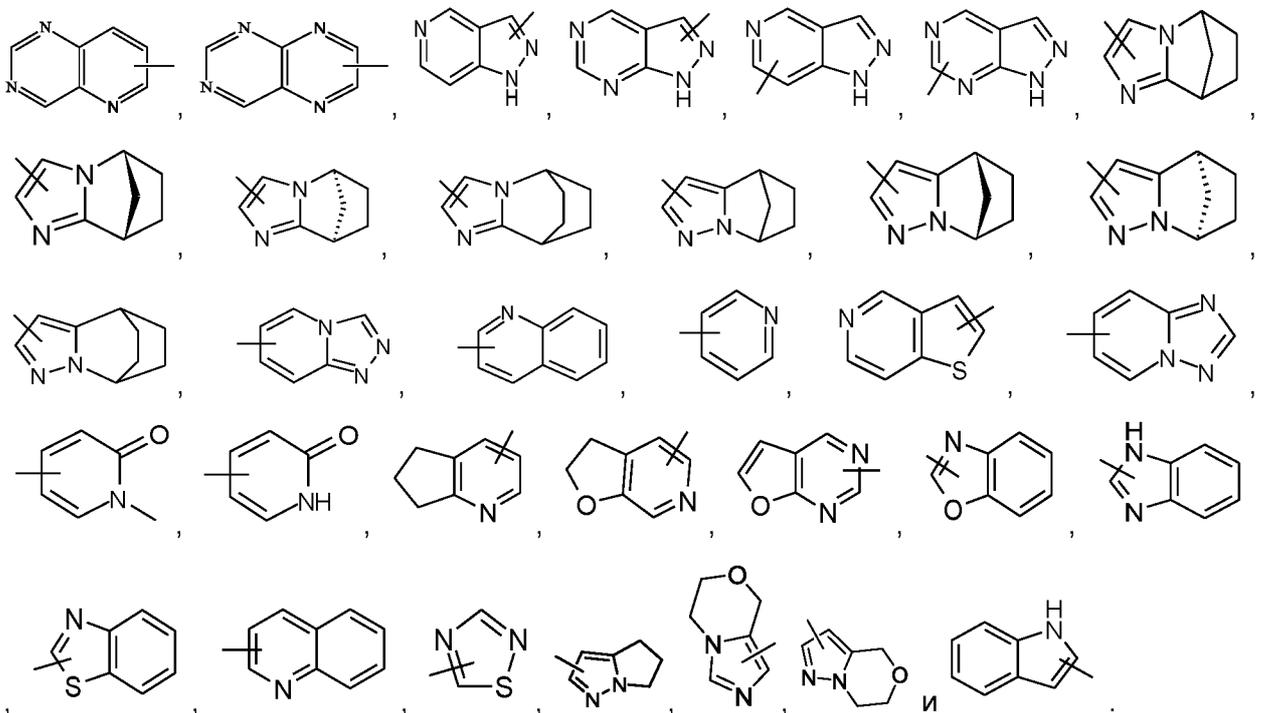


Гетероциклическое кольцо включает кольца, в которых описанный выше гетероцикл (включая моноциклические, спирогетероциклические, конденсированные гетероциклические и мостиковые гетероциклические кольца) конденсирован с арильным,



выбраны из группы, состоящей из кислорода, серы и азота. Гетероарил предпочтительно является 5-10-членным (например, 5, 6, 7, 8, 9 или 10-членным), и более предпочтительно 5- или 6-членным, например, фуранил, тиенил, пиридилил, пирролил, *N*-алкилпирролил, пиримидинил, пиразинил, пиридазинил, имидазолил, пиразолил, триазолил и тетразолил. Гетероарильное кольцо включает кольца, в которых гетероарильное кольцо, описанное выше, конденсировано с арильным, гетероциклическим или циклоалкильным кольцом, при этом кольцо, присоединенное к исходной структуре, представляет собой гетероарильное кольцо; его неограничивающие примеры включают:

10



15

Гетероарил может быть замещенным или незамещенным. Когда он является замещенным, он может быть замещен в любой доступной точке присоединения, при этом заместитель предпочтительно представляет собой один или несколько заместителей, независимо возможно выбранных из группы, состоящей из галогена, алкила, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклилокси, гидроксид, гидроксипиррола, циано, amino, нитро, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила.

20

Описанные выше циклоалкил, гетероциклил, арил и гетероарил включают остатки, полученные из исходного кольца путем удаления одного атома водорода из кольцевого атома, или остатки, полученные из исходного кольца путем удаления двух атомов водорода из одного и того же кольцевого атома или двух разных кольцевых атомов, т.е. «двухвалентный циклоалкил», «двухвалентный гетероциклил», «арилен» или «гетероарилен».

25

Термин «аминозащитная группа» относится к группе, которую можно легко удалить, и предназначен для защиты аминогруппы от изменений, когда реакции происходят в другом месте молекулы. Неограничивающие примеры включают (триметилсилил)этоксиметил, тетрагидропиранил, трет-бутоксикарбонил (Boc), ацетил, бензил, аллил, п-метоксибензил, трет-бутилдиметилсилил (TBS) и тому подобное. Данные группы могут быть возможно замещены 1-3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, алкокси и нитро.

Термин «гидроксизащитная группа» относится к производному гидроксигруппы, которое обычно используется для блокирования или защиты гидроксигруппы во время проведения реакций с другими функциональными группами соединения. В качестве примера предпочтительно, гидроксизащитная группа может представлять собой (C<sub>1-10</sub> алкил или арил)<sub>3</sub>силил, например, триэтилсилил, триизопропилсилил, трет-бутилдиметилсилил (TBS) и трет-бутилдифенилсилил; C<sub>1-10</sub> алкил или замещенный алкил, предпочтительно алкокси или арилзамещенный алкил, более предпочтительно C<sub>1-6</sub> алкоксизамещенный C<sub>1-6</sub> алкил или фенилзамещенный C<sub>1-6</sub> алкил, и наиболее предпочтительно C<sub>1-4</sub> алкоксизамещенный C<sub>1-4</sub> алкил, например, метил, трет-бутил, аллил, бензил, метоксиметил (MOM), этоксиэтил и 2-тетрагидропиранил (THP); (C<sub>1-10</sub> алкил или арил)ацил, например, формил, ацетил, бензоил и п-нитробензоил; (C<sub>1-6</sub> алкил или 6-10-членный арил)сульфонил; или (C<sub>1-6</sub> алкокси или 6-10-членный арилокси)карбонил.

Термин «циклоалкилокси» относится к циклоалкил-О-, где циклоалкил имеет значения, определенные выше.

Термин «гетероциклилокси» относится к гетероциклил-О-, где гетероциклил имеет значения, определенные выше.

Термин «алкилтио» относится к алкил-S-, где алкил имеет значения, определенные выше.

Термин «галогеналкил» относится к алкилу, замещенному одним или несколькими атомами галогена, где алкил имеет значения, определенные выше.

Термин «галогеналкокси» относится к алкокси, замещенному одним или несколькими атомами галогена, где алкокси имеет значения, определенные выше.

Термин «дейтерированный алкил» относится к алкилу, замещенному одним или несколькими атомами дейтерия, где алкил имеет значения, определенные выше.

Термин «гидроксиалкил» относится к алкилу, замещенному одной или несколькими гидроксигруппами, где алкил имеет значения, определенные выше.

Термин «галоген» относится к фтору, хлору, бром или йоду.

Термин «гидрокси» относится к -ОН.

Термин «сульфгидрил» относится к -SH.

Термин «амино» относится к -NH<sub>2</sub>.

Термин «циано» относится к  $-CN$ .

Термин «нитро» относится к  $-NO_2$ .

Термин «оксо» относится к  $\text{<math>=</math>O}$ .

Термин «карбонил» относится к  $C=O$ .

5 Термин «карбоксил» относится к  $-C(O)OH$ .

Термин «карбоксилатная группа» относится к  $-C(O)O(\text{алкил})$ ,  $-C(O)O(\text{циклоалкил})$ ,  $(\text{алкил})C(O)O-$  или  $(\text{циклоалкил})C(O)O-$ , где алкил и циклоалкил имеют значения, определенные выше.

10 «Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC)» означает, что антитело связано посредством линкерного звена с биологически активным цитотоксином или низкомолекулярным лекарственным средством, обладающим активностью, уничтожающей клетки.

Антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, могут быть связаны с эффекторной молекулой любыми способами. Например, антитело или 15 фрагмент антитела могут быть химически или рекомбинантно присоединены к цитотоксическому лекарственному средству. Химические средства получения слитых белков или конъюгатов известны в данной области техники и могут быть использованы для приготовления иммуноконъюгатов. Способ конъюгирования антитела или фрагмента антитела и лекарственного средства должен обеспечивать связывание антитела с 20 цитотоксическим лекарственным средством, не препятствуя способности антитела или фрагмента антитела связываться с молекулой-мишенью.

В одном из вариантов осуществления и антитело, и цитотоксическое лекарственное средство представляют собой белки и могут быть связаны с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. В данной 25 области известны сотни сшивающих агентов, которые могут конъюгировать два белка. Сшивающий агент обычно выбирают, исходя из реакционноспособных функциональных групп, доступных или встроенных в антитело или цитотоксическое лекарственное средство. В альтернативном варианте, если реакционноспособные группы отсутствуют, можно использовать фотоактивируемый сшивающий агент. В некоторых случаях может 30 быть желательным включить спейсер между антителом и цитотоксическим лекарственным средством. Сшивающие агенты, известные в данной области техники, включают гомобифункциональные агенты: глутаральдегид, диметиладипимидат и бис(дiazобензидин), и гетеробифункциональные агенты: *m*-малеимидобензоил-*N*-гидроксисукцинимид и сульфo-*m*-малеимидобензоил-*N*-гидроксисукцинимид.

35 Сшивающие агенты, которые могут использоваться для конъюгации эффекторной молекулы с фрагментом антитела, включают, например, TPCH (S-(2-тиопиридил)-L-цистеин гидразид) и TPMPH (S-(2-тиопиридил)сульфгидрилпропионгидразид). TPCH и TPMPH воздействуют на углеводный фрагмент гликопротеина, который предварительно

был окислен мягкой периодатной обработкой, с образованием гидразоновой связи между гидразидным фрагментом сшивающего агента и альдегидом, образуемым периодатом. Гетеробифункциональные сшивающие агенты GMBS (N-(γ-малеимидобутирилокси)сукцинимид) и SMCC (сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан) подвергают взаимодействию с первичным амином, вводя таким образом малеимидную группу в компонент. Затем данная малеимидная группа может реагировать с сульфгидрильной группой на другом компоненте, который может быть введен сшивающим агентом, образуя таким образом стабильную тиоэфирную связь между компонентами. Если стерическое несоответствие между компонентами препятствует активности любого из компонентов, можно использовать сшивающий агент для введения длинного спейсера между компонентами, такой как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP). Таким образом, существует множество подходящих сшивающих агентов, которые можно использовать и выбирать в индивидуальном порядке в зависимости от их влияния на выход оптимального иммуноконъюгата.

Лекарственная нагрузка, также называемая соотношением лекарственного средства и антитела (DAR), относится к среднему числу лекарственных средств, связанных с каждым антителом в ADC. Она может находиться в диапазоне, например, от примерно 1 до примерно 10 лекарственных средств, конъюгированных с каждым антителом, а в некоторых вариантах осуществления - от примерно 1 до примерно 8 лекарственных средств, конъюгированных с каждым антителом, предпочтительно выбрана из группы, состоящей из 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 3-4, 3-5, 5-6, 5-7, 5-8 и 6-8 лекарственных средств, конъюгированных с каждым антителом. В качестве иллюстрации, лекарственная нагрузка может представлять собой среднее число от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10. Общие формулы ADC по настоящему изобретению включают группу конъюгатов антитело-лекарственное средство в пределах определенного диапазона, описанного выше. В вариантах осуществления настоящего изобретения лекарственная нагрузка может быть представлена как  $n$ , которое представляет собой десятичное или целое число. Лекарственную нагрузку можно определить обычными способами, такими как УФ/видимая спектроскопия, масс-спектрометрия, анализ ELISA и ВЭЖХ.

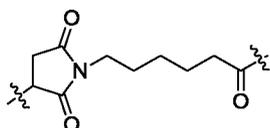
Термин «линкерное звено» или «линкерный фрагмент» относится к фрагменту или химической структуре или связи, которая связана с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом на одном конце и с лекарственным средством на другом конце, а также может быть связана с лекарственным средством после связывания с другим линкером.

Термин «линкер» может содержать один или несколько линкерных компонентов. Примеры линкерных компонентов включают 6-малеимидокапроил («MC»), малеимидопропионил («MP»), валин-цитруллин («val-cit» или «vc»), аланин-фенилаланин («ala-phe»), *p*-аминобензилоксикарбонил («PAB»), а также те, которые были получены в

результате связывания с линкерным реагентом: N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)пентаноат («SPP»), N-сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1 карбоксилат («SMCC», также обозначенный в данном документе как «MCC»), и N-сукцинимидил(4-иод-ацетил)аминобензоат («SIAB»). Линкер может включать удлинители, спейсеры и аминокислотные звенья и может быть синтезирован с использованием способов, известных в данной области техники, например, способов, описанных в US2005-0238649A1. Линкер может представлять собой «расщепляемый линкер», способствующий высвобождению лекарственного средства в клетки. Например, можно использовать кислотолabile линкеры (например, гидразоны), чувствительные к протеазе (например, чувствительные к пептидазе) линкеры, фотолabile линкеры, диметилвые линкеры или линкеры, содержащие дифульфиды (Chari et al., Cancer Research, 52: 127-131 (1992 г.), патент США № 5208020).

Линкерные компоненты включают, помимо прочего:

MC = 6-малеимидокапроил, структура которого показана ниже:

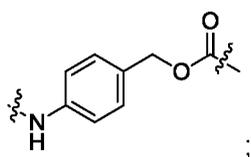


15

Val-Cit или «vc» = валин-цитруллин (типичный дипептид в расщепляемом протеазой линкере),

цитруллин = 2-амино-5-уреидопентановая кислота,

Группа PAB = п-аминобензилоксикарбонил (пример «саморасщепляющихся» линкерных компонентов), структура которого показана ниже:



25

Me-Val-Cit = N-метил-валин-цитруллин (где линкерная пептидная связь была модифицирована для предотвращения ее расщепления катепсином В),

MC(PEG)6-OH = малеимидокапроилполиэтиленгликоль (присоединяемый к цистеину антитела),

SPP = N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)валерат,

SPDP = N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат,

SMCC = сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, и

IT = иминотиолан.

30

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения цитотоксическое лекарственное средство связано с сульфгидрильной группой антитела посредством линкерного звена.

Нагрузку конъюгата антитело-лекарственное средство можно контролировать следующими неограничивающими способами, включая:

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

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

(2) контроль времени и температуры реакции, и

(3) выбор различных реагентов для реакции.

5 «Возможно» или «возможный» означает, что описанное далее событие или обстоятельство может произойти, но не обязательно, и что описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит или не происходит. Например, «C<sub>1-6</sub> алкил, который возможно замещен галогеном или цианогруппой» означает, что галоген или цианогруппа могут, но не обязательно, существовать, и описание включает случай, когда  
10 алкил замещен галогеном или цианогруппой, и случай, когда алкил не замещен галогеном или цианогруппой.

«Замещенный» означает, что один или несколько, предпочтительно 1-6, более предпочтительно 1-3 атома водорода в группе независимо замещены соответствующим числом заместителей. Специалисты в данной области техники могут определить  
15 (экспериментально или теоретически) возможную или невозможную замену без особых усилий. Например, он может быть нестабильным, когда амино- или гидроксигруппа, имеющая свободный водород, связана с атомом углерода, имеющим ненасыщенную (например, олефиновую) связь.

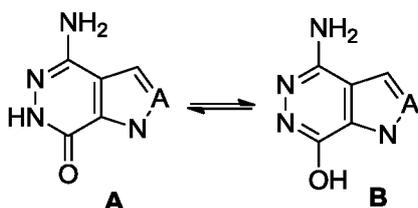
«Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли соединения по  
20 настоящему изобретению, которая может быть выбрана из группы, состоящей из неорганических и органических солей. Соли безопасны и эффективны для применения в организме млекопитающих и обладают необходимой биологической активностью. Соли могут быть получены отдельно во время конечного разделения и очистки соединения или путем взаимодействия соответствующей группы с соответствующим основанием или  
25 кислотой. Основания, обычно используемые для образования фармацевтически приемлемых солей, включают неорганические основания, такие как гидроксид натрия и гидроксид калия, и органические основания, такие как аммиак. Кислоты, обычно используемые для образования фармацевтически приемлемых солей, включают неорганические кислоты и органические кислоты.

30 В настоящем изобретении концентрация конъюгата антитело-лекарственное средство выражается через концентрацию белка, т.е. концентрацию фрагмента антитела в конъюгате антитело-лекарственное средство.

Применительно к лекарственным средствам или фармакологически активным агентам термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству  
35 лекарственного средства или агента, которое достаточно для обеспечения требуемого эффекта, но не является токсичным. Определение эффективного количества варьируется от человека к человеку. Оно зависит от возраста и общего состояния субъекта, а также от конкретного используемого действующего вещества.

Соответствующее эффективное количество в конкретном случае может определить специалист в данной области техники с помощью рутинных тестов.

Соединения и промежуточные соединения по настоящему изобретению также могут находиться в различных таутомерных формах, при этом все такие формы включены в объем настоящего изобретения. Термин «таутомер» или «таутомерная форма» относится к структурным изомерам с разной энергией, которые могут взаимопревращаться через низкий энергетический барьер. Например, протонные таутомеры (также известные как таутомеры с переносом протонов) включают взаимное превращение посредством миграции протонов, такие как кето-енольная и имин-енаминная, лактам-лактимная изомеризация. Пример лактам-лактимного равновесия присутствует между А и В, как показано ниже.



Все соединения в настоящем изобретении могут быть представлены как форма А или форма В. Все таутомерные формы входят в объем настоящего изобретения. Номенклатура соединений не исключает каких-либо таутомеров.

«Пролекарство» относится к веществу, которое может превращаться *in vivo* в физиологических условиях, например, посредством гидролиза в крови, с образованием активного пролекарственного соединения.

Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый» означает, что эти соединения, вещества, композиции и/или лекарственные формы, в пределах рационального клинического мышления, подходят для применения в контакте с тканями субъектов без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции, или других проблем или осложнений, и соразмерны с разумным соотношением польза/риск и эффективны для предполагаемого применения.

Для приготовления обычных фармацевтических композиций можно обратиться к Китайской Фармакопее.

Используемые в данном документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число и наоборот, если иное явным образом не указано в контексте.

«Примерно», описанный в данном документе, означает, что он находится в диапазоне допустимой погрешности для конкретного значения, определенного специалистом в данной области техники, что будет зависеть частично от того, как значение измеряется или определяется, т.е. от ограничений системы измерения. В контексте конкретного анализа, результата или варианта осуществления «примерно» означает, что признак находится в пределах одного стандартного отклонения в

соответствии с практикой в данной области, если иное явным образом не указано в примере или где-либо еще в описании.

5 Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтической композиции, который отличается от активного ингредиента и не является токсичным для субъекта. Фармацевтически приемлемые носители включают, помимо прочего, буферы, наполнители, стабилизаторы или консерванты.

10 Термин «упаковочный вкладыш» используется для обозначения инструкций, обычно включенных в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях, касающихся применения таких терапевтических продуктов.

15 Термин «субъект» или «индивидуум» включает как человека, так и животных, не являющихся человеком. К животным, отличным от человека, относятся все позвоночные (например, млекопитающие и немлекопитающие), такие как приматы, кроме человека (например, яванские обезьяны), овцы, собаки, коровы, куры, амфибии и рептилии. Если не указано иное, термины «пациент» и «субъект» используются в данном документе взаимозаменяемо. Используемый в настоящем документе термин «яванский макак (супо)» или «супомолгус» относится к *Macaca fascicularis*. В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект представляет собой человека.

20 Термин «эксципиент» представляет собой добавку, помимо основного лекарственного средства, к фармацевтической композиции. Его также можно назвать вспомогательным веществом. Например, связующие, наполнители, разрыхлители и смазочные вещества в таблетках; матричная часть в полутвердых препаратах-мазях или кремах; консерванты, антиоксиданты, вкусовые добавки, ароматизаторы, соразтворители, эмульгаторы, солюбилизаторы, регуляторы осмотического давления, красители и т.п. в жидких композициях все могут называться эксципиентами.

30 Термин «разбавитель», также называемый наполнителем, используется в первую очередь для увеличения массы и объема таблетки. Добавление разбавителя не только обеспечивает определенный объем, но и уменьшает отклонение по дозе основных ингредиентов, а также улучшает пластичность при прессовании лекарственного средства и тому подобное. Когда лекарственное средство в таблетированной форме содержит масляные компоненты, необходимо добавлять абсорбент для поглощения масляных компонентов, чтобы сохранить «сухое» состояние и таким образом облегчить процесс получения таблетки. Примеры включают крахмал, лактозу, неорганические соли кальция, микрокристаллическую целлюлозу и тому подобное.

35 Термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей одно или несколько соединений или их физиологически/фармацевтически приемлемых солей или их пролекарств, описанных в настоящем документе, и другие химические

компоненты, например, физиологически/фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества. Фармацевтическая композиция предназначена для облегчения введения в организм, чтобы способствовать всасыванию активного ингредиента, тем самым проявляя биологическую активность.

5 Фармацевтическая композиция может находиться в форме стерильного инъекционного водного раствора. Доступные и приемлемые носители или растворители включают воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Стерильный инъекционный препарат может представлять собой стерильную инъекционную микроэмульсию типа «масло в воде», в которой активный ингредиент растворен в  
10 масляной фазе. Например, активный ингредиент растворяют в смеси соевого масла и лецитина. Затем масляный раствор добавляют в смесь воды и глицерина и обрабатывают с образованием микроэмульсии. Инъекционный препарат или микроэмульсию можно вводить субъекту локально в кровоток субъекта в больших количествах. В качестве альтернативы может быть желательным вводить раствор и  
15 микроэмульсию таким образом, чтобы поддерживать постоянную циркулирующую концентрацию соединения по настоящему изобретению. Для поддержания такой постоянной концентрации может использоваться устройство для непрерывного внутривенного введения. Примером такого устройства является помпа для внутривенного введения Deltac CADD-PLUS. TM. 5400.

20 Фармацевтическая композиция может находиться в форме стерильной инъекционной водной или масляной суспензии для внутримышечного и подкожного введения. Суспензия может быть приготовлена в соответствии с известным уровнем техники с использованием подходящих диспергаторов или смачивающих агентов и суспендирующих агентов, как описано выше. Стерильный инъекционный препарат также  
25 может представлять собой стерильную инъекцию или суспензию, приготовленную в парентерально приемлемом нетоксичном разбавителе или растворителе, например, раствор, приготовленный на 1,3-бутандиоле. Кроме того, стерильное нелетучее масло может быть традиционно использовано в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели может быть использована любая смесь нелетучих масел, в том  
30 числе синтетических моноглицеридов или диглицеридов. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, также могут использоваться при приготовлении инъекций.

Термин «введение» или «осуществление введения» применительно к животным, людям, подопытным объектам, клеткам, тканям, органам или биологическим жидкостям относится к контакту экзогенного лекарственного средства, терапевтического агента,  
35 диагностического агента или композиции с животными, людьми, субъектами, клетками, тканями, органами или биологическими жидкостями.

Термин «образец» относится к совокупности аналогичных жидкостей, клеток или тканей, выделенных у субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в

организме субъекта. Типичными образцами являются биологические жидкости (такие как кровь; сыворотка; серозные жидкости; плазма; лимфа; моча; слюна; кистозные жидкости; слезы; выделения; мокрота; слизистые выделения секреторной ткани и органов; влагалищные выделения; асцит; жидкости в плевре; перикард; брюшина; брюшная  
5 полость; брюшная полость и другие полости тела; жидкости, собранные при промывании бронхов; синовиальные жидкости; жидкие растворы, контактирующие с субъектом или биологическим источником, например, среды для культивирования клеток и органов (включая кондиционированные среды для клеток или органов); жидкости для промывания; и т.п.), образцы биопсии тканей, тонкоигольные пункции, хирургически  
10 иссеченные ткани, органнне культуры или клеточные культуры.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к соли конъюгатов антитело-лекарственное средство, описанных в настоящем изобретении, или к соли соединения, описанного в настоящем изобретении. Такие соли безопасны и эффективны при использовании в организме млекопитающего и обладают необходимой  
15 биологической активностью. Конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные в настоящем изобретении, содержат по меньшей мере одну аминокгруппу и, следовательно, могут образовывать соли с кислотами.

«Лечение» или «лечить» (и их грамматические вариации) относятся к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение пациента,  
20 проходящего лечение, которое может быть выполнено либо для профилактики, либо при наличии клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают, среди прочего, следующие: предупреждение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, облегчение/уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение  
25 скорости прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение течения заболевания, а также регрессию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению используются для отсрочивания развития или замедления прогрессирования заболевания.

«Эффективное количество», как правило, представляет собой количество,  
30 достаточное для уменьшения тяжести и/или частоты симптомов, устранения симптомов и/или основных причин, предотвращения появления симптомов и/или их основных причин и/или облегчения или улучшения повреждений (например, заболевания легких), вызванных или связанных с болезненным состоянием. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество является терапевтически эффективным или  
35 профилактически эффективным. «Терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для болезненного состояния или состояния, в частности, состояния или состояния, ассоциированного с болезненным состоянием, или для иного предотвращения, затруднения, препятствования или обращения вспять

прогрессирования болезненного состояния или любых других нежелательных симптомов, связанных с заболеванием каким-либо образом. «Профилактически эффективное количество» — это количество, которое при введении субъекту будет иметь заранее определенный профилактический эффект, например, предотвращение или отсрочивание

5 возникновения (или рецидива) болезненного состояния или снижение вероятности возникновения (или рецидива) болезненного состояния или связанных с ним симптомов. Полное лечение или профилактика не обязательно наступают после введения одной дозы и может произойти после введения серии доз. Таким образом, терапевтически или

10 профилактически эффективное количество может быть введено в одной или нескольких дозах. «Терапевтически эффективное количество» и «профилактически эффективное количество» могут варьироваться в зависимости от следующих факторов: например, степень заболевания, возраст, пол и масса тела человека, а также способность

15 терапевтического агента или комбинации терапевтических агентов вызывать требуемую реакцию у человека. Типичными показателями эффективного терапевтического агента или комбинации терапевтических агентов являются, например, улучшение состояния здоровья субъекта.

Один или несколько вариантов осуществления настоящего изобретения подробно охарактеризованы в описании выше. Хотя в практике или тестировании настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, подобные или

20 идентичные описанным в данном документе, предпочтительные способы и материалы описаны ниже. Другие признаки, цели и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из описания и формулы изобретения. В описании и формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если иное явно не указано в контексте. Если не указано иное, все технические и научные термины,

25 используемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Все патенты и публикации, цитируемые в описании, включены посредством ссылки. Следующие примеры приведены для того, чтобы более полно проиллюстрировать предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения. Эти примеры никоим образом не

30 следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения, который определен формулой изобретения.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

Настоящее изобретение дополнительно описано ниже со ссылкой на примеры, но

35 данные примеры не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Экспериментальные способы без конкретных условий, указанных в примерах или тестовых примерах по настоящему изобретению, как правило проводят в соответствии с общепринятыми условиями или в соответствии с условиями, рекомендованными

производителем исходных материалов или коммерческих продуктов. См. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., Greene Publishing Association, Wiley Interscience, NY. Реагенты без указания конкретного происхождения представляют собой  
 5 коммерчески доступные типовые реагенты. Заявка WO2020063676 A1 включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Примеры

#### Пример 1: конструкция клеточных штаммов, высокоэкспрессирующих 10 нектин-4

Лентивирусные экспрессионные векторные плазмиды PBABE-Нектин 4, упаковочные векторы лентивирусной системы pVSV-G и pGag-pol трансфицировали в вирусные упаковывающие клетки 293T с использованием реактива для трансфекции Lipofectamine 3000. Собирали супернатант среды, содержащий вирусы, фильтровали и  
 15 центрифугировали на сверхвысокой скорости. Клетки яичника китайского хомячка CHO-K1 инфицировали концентрированным вирусом, подвергали скринингу с использованием пурамицина в течение двух-трех недель и подвергали сортировке одиночных клеток FACS.

На основании уровней экспрессии нектин-4 на поверхности клеток CHO-K1, инфицированных лентивирусом, определенных с помощью FACS, проводили отбор,  
 20 размножение и криоконсервацию штаммов моноклональных клеток с высокой экспрессией нектин-4 для дальнейшего использования.

Аминокислотная последовательность нектин-4 человека (UniProtKB - Q96NY8-1)  
 MPLSLGAEMWGPEAWLLLLLLLLASFTGRCPAGELETSVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQV  
 25 GQVAWARVDAGEGAQELALLHSHKYGLHVSPAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGE  
 YECRVSTFPAGSFQARLRLRVLPPLPSLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVK  
 GTTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVRG  
 LEDQNLWHIGREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGFPLTTEHSGIYVC  
 HVSNEFSSRDSQVTVDVLDPQEDSGKQVDLVSASVVVGVIAALLFCLLVVVVLMSTRYHRRK  
 30 AQQMTQKYEEELTLTRENSIRRLHSHHTDPRSQPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEP  
 EGRSYSTLTTVREIETQTELLSPGSGRAEEEEEDQDEGIKQAMNHFVQENGLRAKPTGNGIYIN  
 GRGHLV SEQ ID NO: 1

Антитело положительного контроля EV201 было получено в соответствии с  
 35 WO2012047724 (стр. 115). Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей EV201 (энфортумаб ведотин) следующие:

Тяжелая цепь EV201:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNNMNWVRQAPGKGLEWWSYISSSSSTIYYADS  
 VKGRFTISRDNKNSLSLQMNLSLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSV  
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI  
 5 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS  
 LSPGK

SEQ ID NO: 2

10 Легкая цепь EV201:

DIQMTQSPSSVSASVVGDRVTITCRASQGISGWLAWYQQKPGKAPKFLIYAASSTLQSGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIK  
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD  
 STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15

SEQ ID NO: 3

**Пример 2: Скрининг на моноклональное антитело против человеческого нектина-4**

Положительный клон получали путем пэннинга с использованием  
 20 полусинтетической фаговой библиотеки полностью человеческих антител и антигена  
 биотинилированного человеческого нектина-4 (приобретенного у компании Beijing  
 ACROBiosystems Biotech Ltd., кат. № NE4-H82E7) с последующим фаговым обнаружением  
 посредством ELISA. Положительный клон секвенировали. После получения  
 последовательности положительный клон встраивали в вектор экспрессии белка Phr-IgG  
 25 и экспрессировали на HEK293 и Expi-CHO-S. После очистки были проведены анализы  
 FACS и проверки эндоцитарной активности, и в итоге была отобрана молекула полностью  
 человеческого антитела NEC49.

Последовательности варибельной области молекулы полностью человеческого  
 антитела NEC49 следующие:

30 Варибельная область тяжелой цепи NEC49:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWWSAIYSGGSTYYADS  
 VKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCTRHHGGDSGSWSYYYYY GMDVWGQGTTVTV  
 SS

SEQ ID NO: 6

35 Варибельная область легкой цепи NEC49:

DIQMTQSPSSLSASVVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG  
 SSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 7

Таблица 2. Последовательности CDR, полученные по схеме нумерации Chothia

Антитело	NEC49	SEQ ID NO
CDR1 тяжелой цепи	GFTFSSY	SEQ ID NO: 8
CDR2 тяжелой цепи	YSGGS	SEQ ID NO: 9
CDR3 тяжелой цепи	HGGDSGSWSYYYYGMDV	SEQ ID NO: 10
CDR1 легкой цепи	RASQSISSYLN	SEQ ID NO: 11
CDR2 легкой цепи	AASSLQS	SEQ ID NO: 12
CDR3 легкой цепи	QQSYSTPLT	SEQ ID NO: 13

Таблица 3. Последовательности CDR, полученные по схеме нумерации IMGT

5

Антитело	NEC49	SEQ ID NO
CDR1 тяжелой цепи	GFTFSSYA	SEQ ID NO: 14
CDR2 тяжелой цепи	IYSGGST	SEQ ID NO: 15
CDR3 тяжелой цепи	TRHGGDSGSWSYYYYGMDV	SEQ ID NO: 16
CDR1 легкой цепи	QSISSY	SEQ ID NO: 17
CDR2 легкой цепи	AAS	SEQ ID NO: 18
CDR3 легкой цепи	QQSYSTPLT	SEQ ID NO: 13

Таблица 4. Последовательности CDR, полученные по схеме нумерации Kabat

Антитело	NEC49	SEQ ID NO
CDR1 тяжелой цепи	SYAMS	SEQ ID NO: 19
CDR2 тяжелой цепи	AIYSGGSTYYADSVKG	SEQ ID NO: 20
CDR3 тяжелой цепи	HGGDSGSWSYYYYGMDV	SEQ ID NO: 10
CDR1 легкой цепи	RASQSISSYLN	SEQ ID NO: 11
CDR2 легкой цепи	AASSLQS	SEQ ID NO: 12
CDR3 легкой цепи	QQSYSTPLT	SEQ ID NO: 13

10 Константная область тяжелой цепи NEC49:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  
15 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHN  
HYTQKSLSLSPGK

Константная область легкой цепи NEC49:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD  
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

SEQ ID NO: 5

Тяжелая цепь NEC49:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWWSAIYSGGSTYYADS  
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHHGGDSGSWSYGGMDVWGQGTTVTV  
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
10 YLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF  
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  
TVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEAL  
HNHYTQKSLSLSPGK

15

SEQ ID NO: 21

Легкая цепь NEC49:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDISTYLSSTLTLSKADYE  
20 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 22

### **Пример 3: конструкция молекул ADC** **Определение лекарственной нагрузки ADC**

25 Лекарственную нагрузку в ADC определяли с помощью обращенно-фазовой  
высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ).

#### **1. Способ определения:**

Голое антитело и тестируемый образец ADC (в концентрации 1 мг/мл)  
восстанавливали 4 мкл DDT (сигма) на водяной бане при 37°C в течение 1 часа, а затем  
30 переносили на вставку. Анализ выполняли на высокоэффективном жидкостном  
хроматографе Agilent 1200, в качестве хроматографической колонки была выбрана Agilent  
PLRP-S 1000A 8 мкм 4,6×250 мм, температура колонки 80°C, диодно-матричный детектор  
(DAD) с длиной волны 280 нм, скорость потока 1 мл/мин и объем инъекции 40 мкл. Были  
проведены сравнения спектров образца и голого антитела для идентификации  
35 местоположений легкой цепи и тяжелой цепи, а затем было выполнено интегрирование  
спектра тестируемого образца для расчета значения DAR.

#### **2. Получение растворов**

1) 0.25 М раствор DTT:

2) Подвижная фаза А (0.1% TFA в воде):

3) Подвижная фаза В (0.1% TFA в воде):

### 3. Анализ данных

5 Были проведены сравнения спектров образца и голого антитела для идентификации местоположений легкой цепи и тяжелой цепи, а затем было выполнено интегрирование спектра тестируемого образца для расчета значения лекарственной нагрузки DAR.

Формула расчета следующая:

Наименование	Число связанных ЛС
LC	0
LC+1	2
HC	0
HC+1	2
HC+2	4
HC+3	6

10 Общая площадь пика LC = площадь пика LC + площадь пика LC+1

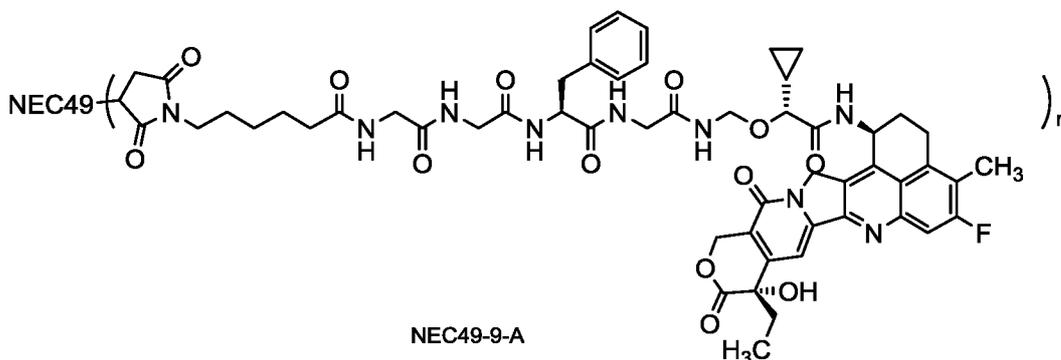
Общая площадь пика HC = площадь пика HC + площадь пика HC+1 + площадь пика HC+2 + площадь пика HC+3

DAR LC =  $\Sigma$  (число связанных ЛС × процент площади пика)/общая площадь пика LC

DAR HC =  $\Sigma$  (число связанных ЛС × процент площади пика)/общая площадь пика HC

15 DAR = DAR LC + DAR HC

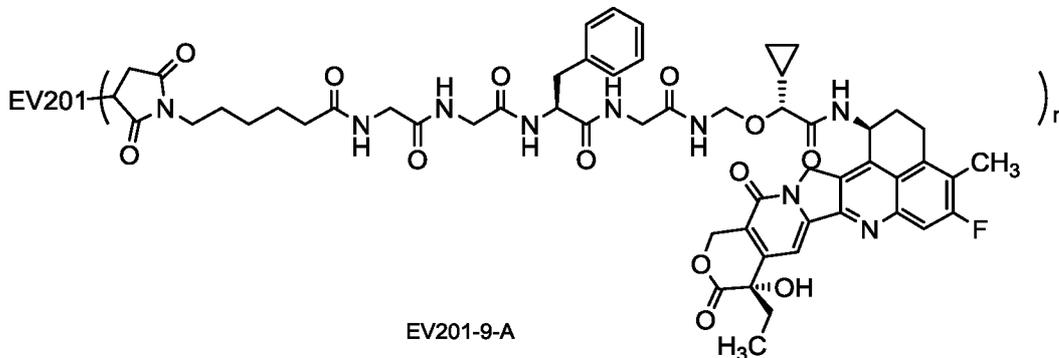
### Пример 4: ADC-1



20 К водному раствору антитела NEC49 в PBS (pH 6,5, 0,05 М водный раствор PBS; 10,0 мг/мл, 6,4 мл, 432 нмоль) добавляли при 37°C приготовленный водный раствор трис(2-карбоксиэтил)фосфингидрохлорида (ТСЕР-НСl) (10 мМ, 130 мкл, 1300 нмоль). Смесь встряхивали на водяной бане-шейкере при 37°C в течение 3 часов, затем реакцию останавливали. Реакционную смесь охлаждали до 25°C на водяной бане.

Соединение **9-A** (полученное с использованием способа получения соединения 9-A из примера 9, изложенного на страницах 58-60 WO2020063676, 5,6 мг, 5214 нмоль) растворяли в 300 мкл ДМСО и полученный раствор добавляли к указанной выше реакционной смеси. Смесь встряхивали на водяной бане-шейкере при 25°C в течение 3 часов, затем реакцию останавливали. Реакционную смесь обессоливали и очищали с использованием гелевой колонки Sephadex G25 (фаза для элюирования: pH 6,5, 0,05 М водный раствор PBS, содержащий 0,001 М ЭДТА) с получением примера продукта указанного в заголовке конъюгата общей формулы NEC49-9-A, **ADC-1**, в PBS (2,89 мг/мл, 21 мл). Затем продукт хранили при температуре 4°C. Средняя нагрузка, рассчитанная с помощью ОФ-ВЭЖХ: n = 4,90.

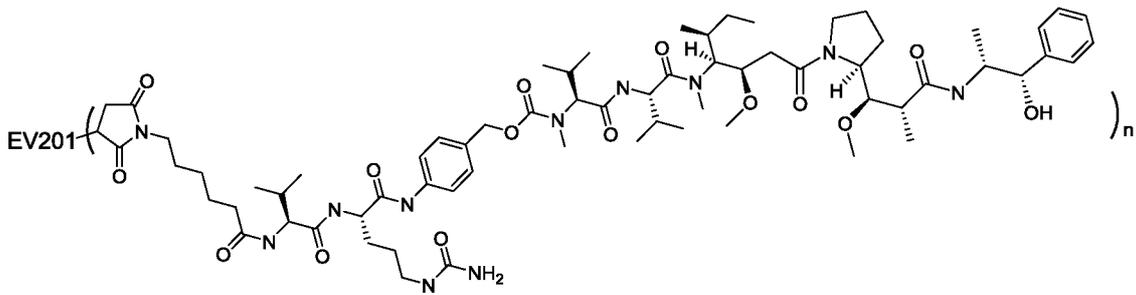
#### Пример 5: ADC-2



К водному раствору антитела EV201 в PBS (pH 6,5, 0,05 М водный раствор PBS; 10,0 мг/мл, 1,63 мл, 110 нмоль) добавляли при 37°C приготовленный водный раствор трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорида (TCEP-HCl) (10 мМ, 28,5 мкл, 285 нмоль). Смесь встряхивали на водяной бане-шейкере при 37°C в течение 3 часов, затем реакцию останавливали. Реакционную смесь охлаждали до 25°C на водяной бане.

Соединение **9-A** (1,18 мг, 1100 нмоль) растворяли в 90 мкл ДМСО и полученный раствор добавляли к указанной выше реакционной смеси. Смесь встряхивали на водяной бане-шейкере при 25°C в течение 3 часов, затем реакцию останавливали. Реакционную смесь обессоливали и очищали с использованием гелевой колонки Sephadex G25 (фаза для элюирования: pH 6,5, 0,05 М водный раствор PBS, содержащий 0,001 М ЭДТА) с получением примера продукта указанного в заголовке конъюгата общей формулы EV201-9-A, **ADC-2**, в PBS (1,12 мг/мл, 12 мл). Затем продукт хранили при температуре 4°C. Средняя нагрузка, рассчитанная с помощью ОФ-ВЭЖХ: n = 3,90.

#### Пример 6: ADC-3



EV201-MMAE

К водному раствору антитела EV201 в PBS (pH 6,5, 0,05 М водный раствор PBS; 10,0 мг/мл, 6,67 мл, 248 нмоль) добавляли при 37°C приготовленный водный раствор трис(2-карбоксиил)фосфин гидрохлорида (TCEP-HCl) (10 мМ, 64,4 мкл, 644 нмоль).

5 Смесь встряхивали на водяной бане-шейкере при 37°C в течение 3 часов, затем реакцию останавливали. Реакционную смесь охлаждали до 25°C на водяной бане.

Соединение VcMMAE (Biochempartner, CAS 646502-53-6, 3,3 мг, 2480 нмоль) растворяли в 150 мкл ДМСО и полученный раствор добавляли к указанной выше реакционной смеси. Смесь встряхивали на водяной бане-шейкере при 25°C в течение 3  
10 часов, затем реакцию останавливали. Реакционную смесь обессоливали и очищали с использованием гелевой колонки Sephadex G25 (фаза для элюирования: pH 6,5, 0,05 М водный раствор PBS, содержащий 0,001 М ЭДТА) с получением примера продукта указанного в заголовке конъюгата общей формулы EV201-MMAE, ADC-3, в PBS (2,71 мг/мл, 14 мл). Затем продукт хранили при температуре 4°C. Средняя нагрузка,  
15 рассчитанная с помощью ОФ-ВЭЖХ:  $n = 4,09$ .

## Биологические анализы

### Пример испытаний 1: уровень аффинности антитела и кинетика

Проводили анализ антитела против нектин-4 посредством Biacore T200 (GE) для  
20 характеристики аффинности и кинетики связывания. Биосенсорный чип с белком А (кат. № 29127556, GE) использовали для аффинного захвата антител IgG, и затем давали человеческому нектин-4 His (кат. № 19771-H08H, Sino Biological) антигену, который был разведен буфером HBS-EP (pH 7,4) (кат. № BR-1001-88, GE) до серий концентраций, растекаться по поверхности чипа. Кинетику связывания антиген-антитело отслеживали в  
25 течение 3 минут, а кинетику диссоциации – в течение 10 минут. Сигналы реакции детектировали в режиме реального времени с использованием прибора Biacore T200 для получения кривых связывания и диссоциации. После завершения диссоциации в каждом цикле биосенсорный чип промывали 10 мМ Gly-HCl, pH 1,5 (кат. № BR-1003-54, GE) для регенерации. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения  
30 BIAevaluation от GE с использованием модели связывания 1:1 (Лэнгмюра). Определенные таким образом значения  $k_a$  (kon),  $k_d$  (koff) и KD приведены в таблице 5.

Таблица 5: аффинность антител, определенная посредством Biacore

Антитело	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
EV201	7,09E+05	6,61E-03	9,33E-09
NEC49	3,67E+05	1,89E-03	5,15E-09

Заключение:

NEC49 обладает немного лучшей аффинностью к человеческому белку нектину-4, чем контрольная молекула EV201.

5

### Пример испытаний 2: *In Vitro* связывание антител с клетками

Клетки Нектин4-CHOK1/T47D/MDA-MB-468 суспендировали в буфере FACS (2% фетальная бычья сыворотка (Gibco, 10099141), PBS, pH 7,4 (Sigma, P4417-100TAB)) с образованием суспензии клеток в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл и затем указанную суспензию вносили в 96-луночный круглодонный планшет из расчета 100 мкл/луночка. После центрифугирования и удаления супернатанта вносили тестируемые антитела, разведенные буфером FACS до разных концентраций, в количестве 50 мкл/луночка. Планшет инкубировали в защищенном от света месте в холодильнике при температуре 4°C в течение 1 часа. Планшет 3 раза промывали буфером FACS путем центрифугирования при 500 g и затем добавляли козье антитело к IgG человека, конъюгированное с Alexa Fluor 488 (H+L) (invitrogen, A-11013) в рабочей концентрации. Планшет инкубировали в защищенном от света месте в холодильнике при температуре 4°C в течение 40 минут. Планшет 3 раза промывали буфером FACS путем центрифугирования при 500 g и тестировали на проточном цитометре BD FACSCantoll для определения среднего геометрического интенсивности флуоресценции и рассчитывали значения EC<sub>50</sub> связывания антител с клетками, экспрессирующими нектин-4. Результаты показаны в таблице 6 и на фиг. 1, 2 и 3.

Таблица 6. Связывающая активность антител с разными клетками

Клетка	Нектин 4-CHOK1		T47D		MDA-MB-468	
	NEC49	EV201	NEC49	EV201	NEC49	EV201
Максимальное знач-е флуоресценции	82484	65807	13403	12638	10191	9867
EC <sub>50</sub> (нМ)	0,78	0,94	0,07	0,26	0,06	0,23

25

Заклучение:

NEC49 обладает связывающей активностью в отношении ряда клеточных линий, экспрессирующих нектин-4, причем указанная связывающая активность выше, чем у контрольной молекулы EV201.

### Пример испытаний 3: анализ эндоцитоза антитела DT3C

Целью данного анализа является исследование эндоцитоза антитела к нектину-4 по уничтожению клеток активированным DT после того, как белок DT3C проникнет в клетки. Эндоцитозную активность антител *in vitro* оценивали по значениям IC<sub>50</sub> и максимальным значениям уничтожения.

DT3C представляет собой рекомбинантно экспрессируемый слитый белок, образующийся путем слияния фрагмента А дифтерийного токсина (только токсинная часть) и фрагмента 3С стрептококка группы G (часть, связывающая IgG). Белок обладает высокой аффинностью к Fc-части антитела. Он проникает в клетки вместе с Fc-частью при эндоцитозе антитела и высвобождает токсичный DT под действием внутриклеточной фуриновой протеазы. DT может ингибировать активность рибозилирования EF2-ADP, блокировать процесс трансляции белка и в конечном итоге вызывать гибель клеток. DT3C, который не проникает в клетку, не обладает активностью в отношении уничтожения клеток. Эндоцитозную активность антитела оценивали по уничтожению клеток.

Суспензию клеток Нектин4-CHOК1 в концентрации  $2 \times 10^4$  клеток/мл готовили на свежей клеточной среде, содержащей 20% FBS с низким содержанием IgG, и вносили в планшет для культивирования клеток 3903 по 50 мкл на лунку. Планшет инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 16 часов. DT3C разводили до 1,6 мкм бессывороточной средой, а антитела разводили до 266,4 нМ бессывороточной средой. 80 мкл DT3C и 80 мкл антитела смешивали (1:1, об./об.) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Молярная концентрация DT3C была в 6 раз выше концентрации антител.

Смесь DT3C и антитела серийно разводили в 4 раза бессывороточной средой до 8 концентраций. 9-я и 10-я точки были чистой средой. C25-IgG1 представлял собой группу отрицательного контроля по изотипу IgG1. 50 мкл разведенной смеси добавляли к 50 мкл клеток и инкубировали в инкубаторе в течение трех суток. В каждую лунку добавляли по 50 мкл CTG. Планшет инкубировали вдали от света при комнатной температуре в течение 10 минут. Ко дну планшета с клеточной культурой прикрепляли белую мембрану. Планшет помещали на микропланшетный ридер Victor 3 и снимали показания хемилюминесценции. Результаты представлены на фиг. 4 (C25-IgG1 в качестве отрицательного контроля по изотипу IgG1, DT3C в качестве отрицательного контроля) и Таблице 7.

Таблица 7. Эндоцитозная активность антител *in vitro*

Антитело	NEC49	EV201
Максимальное знач-е уничтожения	100,55%	92,59%

IC <sub>50</sub> (нМ)	0,43	0,50
-----------------------	------	------

Закключение:

Анализ DT3C показывает, что NEC49 обладает эндоцитозной активностью в отношении клеток Нектин 4-СНОК1, причем данная эндоцитозная активность немного выше, чем у контрольной молекулы EV201.

5

#### Пример испытаний 4: анализ эндоцитоза антитела с использованием pHrodo

Целью этого анализа является изучение эндоцитоза антитела к нектину-4 по изменениям сигнала флуоресценции после интернализации красителя. Эндоцитозную активность антитела *in vitro* оценивали по интенсивности флуоресцентного сигнала.

10 Fab-фрагменты, связанные с pH-чувствительным красителем pHrodo iFL, могут связываться непосредственно с Fc-областью антитела к нектину-4, не влияя на распознавание антигена антителом. Краситель pHrodo iFL практически не флуоресцирует при нейтральном pH. Когда антитело к нектину-4 подвергается эндоцитозу, краситель в то же самое время интернализуется. Сигнал флуоресценции будет постепенно усиливаться  
15 по мере снижения pH. Эндоцитозную активность антитела оценивали по тому, насколько усиливался сигнал флуоресценции.

Клетки клона 3 Нектин 4-СНОК1 культивировали с DMEM/F12 + 10% FBS + 10 мкг/мл пурамицина. В первые сутки эксперимента клеточную суспензию в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток/мл готовили со свежей средой, содержащей клетки, и добавляли в 96-  
20 луночный планшет для культивирования клеток 3903 из расчета 100 мкл/лунка. Планшет культивировали при 37°C в атмосфере 5% диоксида углерода в течение 24 часов.

4×приготовление антител: исходный раствор антител 10-кратно разводили в среде, не содержащей FBS, для получения раствора среды, и указанный раствор среды разбавляли для получения 4×дозировочного раствора (80 нМ) с конечной концентрацией  
25 антитела 20 нМ.

4×приготовление реагента для мечения Zenon™ pHrodo™ iFL IgG: Исходный раствор реагента для мечения pHrodo™ разводили средой, не содержащей FBS, на 4× концентрации (240 нМ) с конечной концентрацией 60 нМ. Вышеуказанный 4×раствор антител и 4×раствор реагента для мечения pHrodo™ смешивали в равных объемах и  
30 инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. 50 мкл смеси добавляли к 150 мкл бессывороточной среды так, чтобы каждый образец антитела имел две концентрации (20 нМ и 5 нМ).

Из планшета 3903 отбирали 50 мкл клеточного бульона и в каждую лунку добавляли 50 мкл смеси антитела и красителя pHrodo. Для каждого образца антитела  
35 устанавливали две репликатные лунки. Были заданы группа для добавления только красителя и контрольная группа изотипа IgG1.

Через 24 часа культивирования в инкубаторе среду удаляли и клетки в каждой лунке расщепляли 50 мкл панкреатина в течение 2 мин. Расщепление останавливали добавлением 50 мкл свежей среды. Клетки из репликатных лунок того же образца переносили в лунки круглодонного планшета с помощью многоканальной пипетки. Клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 2 мин и среду отбрасывали. Клетки один раз промывали буфером FACS (PBS + 2,5% FBS) и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 2 мин. Клетки ресуспендировали в 200 мкл буфера FACS (PBS + 2,5% FBS) и детектировали FITC сигналы с помощью проточного цитометра. Данные были проанализированы с помощью Flowjo 7.6. Результаты эндоцитоза NEC49 и EV201 на клоне 3 Нектин 4-СНОК1 (С25-IgG1 в качестве отрицательного контроля по изотипу IgG1) представлены в таблице 8, фиг. 5А и Фиг. 5В.

Таблица 8. Эндоцитозная активность антител *in vitro*

Образец	20 нМ антитела + 60 нМ pHrodo	5 нМ антитела + 15 нМ pHrodo
	знач-е сигнала FITC-A	знач-е сигнала FITC-A
NEC49	1084	303
EV201	862	281
С25-IgG1	154	129
pHrodo, без антител	160	127
Среда	11	131

Анализ с использованием pHrodo показывает, что NEC49 обладает эндоцитозной активностью в отношении клеток Нектин 4-СНОК1, причем данная эндоцитозная активность лучше, чем у контрольной молекулы EV201.

#### Пример испытаний 5: клеточная активность молекул ADC

Целью этого анализа является изучение цитотоксического эффекта образцов Нектин 4-ADC на клетки и оценка активности Нектин 4-ADC *in vitro* по IC<sub>50</sub> и максимальным значениям цитотоксичности.

T47D (клетка протоковой карциномы молочной железы человека, ATCC® HTB-133™), MDA-MB-468 (клетка рака молочной железы человека, ATCC® HTB-132™) и MDA-MB-231 (клетка рака молочной железы человека, ATCC® HTB-26™) клетки расщепляли панкреатином, нейтрализовали свежей средой, центрифугировали при 1000 об/мин и затем ресуспендировали в среде. После подсчета плотность клеточной суспензии доводили до 3703 клеток/мл и вносили в 96-луночный планшет для культивирования клеток 3903 по 135 мкл/лунка. Клетки в колонку 11 не добавляли, а добавляли только 135

мкл среды. Планшет инкубировали при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа в течение 16 часов.

Используя концентрацию исходных растворов образцов в качестве исходной, ADC-1 и ADC-2 разводили в пять раз посредством PBS до 8 концентраций. Культуральный планшет вынимали и в каждую лунку добавляли по 15 мкл 10×раствора. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% диоксида углерода в течение 6 суток.

В каждую лунку добавляли по 70 мкл CTG. Планшет инкубировали вдали от света при комнатной температуре в течение 10 мин. Ко дну планшета с клеточной культурой прикрепляли белую мембрану. Планшет помещали на Victor3 и снимали показания хемилюминесценции. Данные этого анализа были обработаны с использованием программного обеспечения для обработки данных GraphPad prism5.0. Результаты показаны в Таблице 9.

Таблица 9. Уничтожение клеток посредством ЛС Нектин 4-ADC

Наименование образца	T47D (+++) IC <sub>50</sub> (нМ)	MDA-MB-468 (++) IC <sub>50</sub> (нМ)	MDA-MB-231 (-) IC <sub>50</sub> (нМ)
ADC-1	111,20	87,52	1758,00
ADC-2	192,60	151,50	967,60

Примечание. + представляет уровень экспрессии нектин 4 в клетках: чем больше +, тем выше уровень экспрессии.

NEC49-9-A (ADC-1) продемонстрировал значительный цитотоксический эффект в клетках с уровнем экспрессии от умеренного до высокого, причем цитотоксический эффект был значительно ниже в клетках с низкой экспрессией и без экспрессии. Это указывает на то, что данная молекула обладает большей селективностью, чем ADC-2.

#### Пример испытаний 6: оценка *In Vivo* эффективности ADC молекул в отношении ксенотрансплантатных опухолей T47D на мышах

Таблетки эстрогена (0,36 мг/таблетка) подкожно инокулировали в левую часть спины каждой голый мыши Balb/c. Через трое суток 0,2 мл ( $10 \times 10^6$ ) клеток T47D (с матригелем, 1:1 (об/об)) подкожно инокулировали в правую часть спины каждой мыши. Когда средний объем опухоли достиг примерно 150 мм<sup>3</sup>, мышей разделили на 5 групп по 8 мышей и начали введение.

Каждой мыши внутривенно вводили три дозы соединения ADC (приготовленного в PBS) в дозе 10 мкл/г массы тела. Группе холостого раствора вводили PBS.

Объемы опухолей и массы тела измеряли два раза в неделю и записывали результаты. Данные записывали с использованием статистической программы Excel:

средние значения рассчитывали как avg; значения среднеквадратического отклонения (SD) рассчитывались как STDEV; значения SEM рассчитывали как STDEV/SQRT (число животных на группу); Для построения графиков использовали программное обеспечение GraphPad Prism, а статистический анализ данных проводили с использованием

5 двухфакторного дисперсионного анализа или однофакторного дисперсионного анализа.

Объем опухоли (V) рассчитывали как:  $V = 1/2 \times L_{\text{длинн}} \times L_{\text{коротк}}^2$ .

Относительный индекс пролиферации опухоли T/C (%) =  $(T - T_0)/(C - C_0) \times 100\%$ , где T и C - объемы опухолей животных в конце эксперимента в группе, получающей лечение и в контрольной группе, соответственно; T<sub>0</sub> и C<sub>0</sub> — объемы опухолей животных в

10 начале эксперимента в группе, получающей лечение и в контрольной группе.

Ингибирование роста опухоли TGI (%) =  $1 - T/C$  (%).

Результаты представлены в таблице 10 и на фиг. 6.

Таблица 10. Эффективность ADC в отношении ксенотрансплантатных опухолей T47D у голых мышей, несущих опухоль

ADC	Ингибирование роста опухоли TGI (%)	
	5 мг/кг массы тела	2.5 мг/кг массы тела
ADC-3	101	73
ADC-1	121	97

В этом анализе тестируемые образцы ADC-3 и ADC-1 продемонстрировали значительное ингибирующее действие на рост ксенотрансплантатных опухолей клеток рака молочной железы человека T47D у мышей, причем действие в значительной

20 степени зависело от дозы. ADC-1 оказывает улучшенное ингибирующее действие на рост опухоли, чем контрольная молекула в идентичных дозах.

#### Пример испытаний 7: Токсичность молекулы ADC у крыс

Крысам SD (самцам, Zhejiang Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.)

25 вводили соединение ADC (приготовленное в физиологическом растворе) через хвостовую вену. Четырем крысам в каждой группе вводили соединение ADC один раз в неделю в течение 3 недель, при этом каждой вводили инъекцию в дозе 5 мл/кг массы тела.

Дизайн эксперимента:

30 Таблица 11. Схема введения для испытаний на токсичность

Группа	ADC соединение	Доза (мг/кг)
Носитель	Физиологический раствор	0

A	ADC-3	50
B	ADC-1	50

Результаты показывают, что: в группе А смерть животных, прекращение приема пищи и быстрая потеря массы тела произошли после первого введения; эксперимент был немедленно прекращен, при вскрытии наблюдались аденомегалия и интуссусцепция. В группе В после трех последовательных введений при клинических наблюдениях за животными, при вскрытии и в функции свертывания крови отклонений не обнаружено. Результаты показаны в Таблице 12.

Таблица 12. Результаты испытаний на токсичность соединений ADC на крысах SD

Показатели отклонений	Гематологические показатели (среднее ± SD)			Биохимические показатели крови (среднее ± SD)		Органные показатели (% , среднее± SD)	
	WBC (*10 <sup>9</sup> /л)	RET (*10 <sup>9</sup> /л)	LYM (*10 <sup>9</sup> /л)	ALT (МЕ/л)	TBIL (мкмоль / л)	Тимус	Печень
50 мг / кг массы тела							
Физиологический р-р	10,6±0,2	306,6±12,1	9,5±0,3	31,9±3,6	0,6±0,4	0,2±0,02	3,3±0,7
ADC-3	2,7±0,7	49,7±14,5	2,5±0,7	422,8±51,0	36,1±11,0	0,2±0,01	4,5±0,04
ADC-1	9,8±1,8	273,9±52,6	8,2±1,5	44,5±7,3	0,3±0,1	0,07±0,02	3,2±0,07

Примечание: WBC (лейкоциты), RET# (ретикулоциты), LYM (лимфоциты), ALT (глицинаминотрансфераза), TBIL (общий билирубин).

Заключение:

В группе, получавшей ADC-3, наблюдалась гибель животных после первого введения и отклонения в ряде гематологических показателей и биохимических показателях крови. После завершения трех последовательных введений группе, получавшей ADC-1, при клинических наблюдениях за животными, при вскрытии и в функции свертывания крови отклонений не выявлено, а значимых отклонений в этих показателях, за исключением значительного уменьшения размеров тимуса, обнаружено не было.

Предварительные результаты испытаний на токсичность на крысах позволяют предположить, что ADC-1 более безопасен *in vivo* и обладает меньшим количеством токсических и побочных эффектов, чем контрольная молекула.

#### Пример испытаний 8: Фармакокинетика молекулы ADC

Каждой крысе F344 RG (самцы, Beijing Vitalstar Biotechnology Co., Ltd.) из групп 4 внутривенно вводили инъекцию в дозе 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела. Образцы цельной крови объемом 0,2 мл собирали перед введением и через 5 минут, 8 часов, 1 сутки, 2 суток, 4 суток, 7 суток, 10 суток, 14 суток, 21 сутки и 28 суток после введения, оставляя при 4°C в течение 30 мин (без антикоагуляции) и центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин. Супернатанты (сыворотку) помещали в EP-пробирки и хранили при -80°C. Концентрацию антител (суммарные антитела) и концентрацию интактного ADC в сыворотке определяли с помощью ELISA. Результаты показаны на фиг. 7 и таблице 13.

10 Полученные результаты:

Таблица 13. ФК период полувыведения и основные фармакокинетические параметры у крыс F344 RG

ADC-1 10 мг/кг	Суммарн. антитела	Интактный ADC
T1/2 (суток)	3,5 ± 0,7	3,1 ± 0,6
AUC 0-t (мкг/мл *ч)	18998,27	18176,38
Cmax (мкг /мл)	346,11	380,57
CL (мл/сут/кг)	12,41	13,15
AUC интактн. ADC/суммарн. антитела	95,7%	

15 Результаты показывают, что ADC-1 обладает относительно хорошей стабильностью в плазме у крыс.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против нектина-4, где указанное антитело против нектина-4 связывается с белком нектин-4, экспрессируемым клетками T47D или клетками MDA-MB-468, со значением  $EC_{50}$  менее 0,1 нМ, определяемым методом FACS.
  
2. Антитело против нектина-4 по п. 1, где указанное антитело против нектина-4 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в вариательной области тяжелой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 6; и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в вариательной области легкой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 7;  
предпочтительно указанное антитело против нектина-4 содержит вариательную область тяжелой цепи и вариательную область легкой цепи, где:
  - а. вариательная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно; а вариательная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13 соответственно;  
причем описанные выше HCDR1-3 и LCDR1-3 определены по схеме нумерации Chothia; или
  - б. вариательная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 соответственно; а вариательная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 13 соответственно;  
причем описанные выше HCDR1-3 и LCDR1-3 определены по схеме нумерации IMGT; или
  - с. вариательная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 10 соответственно; а вариательная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13 соответственно;  
причем описанные выше HCDR1-3 и LCDR1-3 определены по схеме нумерации Kabat.
  
3. Антитело против нектина-4, где указанное антитело против нектина-4 содержит вариательную область тяжелой цепи и вариательную область легкой цепи, где:
  - а. вариательная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно; а вариательная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13 соответственно;  
причем описанные выше HCDR1-3 и LCDR1-3 определены по схеме нумерации Chothia; или

b. переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, описанные в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 соответственно; а переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, описанные в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 13, соответственно;

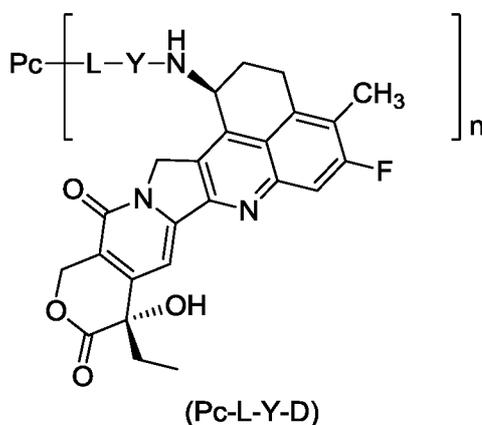
причем описанные выше HCDR1-3 и LCDR1-3 определены по схеме нумерации IMGT; или

c. переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, описанные в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 10 соответственно; а переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, описанные в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13 соответственно;

причем описанные выше HCDR1-3 и LCDR1-3 определены по схеме нумерации Kabat.

4. Антитело против нектин-4 по любому из пп. 1-3, где указанное антитело против нектин-4 представляет собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
5. Антитело против нектин-4 по любому из пп. 1-4, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:  
переменная область тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 6, и/или переменная область легкой цепи имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 7;  
предпочтительно,  
переменная область тяжелой цепи описана в SEQ ID NO: 6, а переменная область легкой цепи описана в SEQ ID NO: 7.
6. Антитело против нектин-4 по любому из пп. 1-5, где указанное антитело против нектин-4 содержит:  
тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 21, и/или легкую цепь, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 22;  
предпочтительно антитело против нектин-4 содержит:  
тяжелую цепь, описанную в SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, описанную в SEQ ID NO: 22.
7. Антитело против нектин-4 по любому из пп. 3-6, где указанное антитело против нектин-4 связывается с белком нектин-4, экспрессируемым клетками T47D или клетками MDA-MB-468, со значением  $EC_{50}$  менее 0,1 нМ, определяемым посредством FACS.
8. Антитело против нектин-4, где указанное антитело конкурирует за связывание с нектином-4 человека с антителом против нектин-4 по любому из пп. 1-7.

9. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело против нектина-4 по любому из пп. 1-8.
10. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 9.
11. Иммуноконъюгат, содержащий антитело против нектина-4 по любому из пп. 1-8 и эффекторную молекулу, где указанная эффекторная молекула связана с антителом против нектина-4; предпочтительно указанная эффекторная молекула выбрана из группы, состоящей из противоопухолевого средства, иммуномодулятора, модификатора биологического ответа, лектина, цитотоксического лекарственного средства, хромофора, флуорофора, хемилюминесцентного соединения, фермента, иона металла и любой их комбинации.
12. Способ иммунодетекции или определения нектина-4 *in vivo* и/или *in vitro*, причем указанный способ включает стадию приведения в контакт антитела против нектина-4 по любому из пп. 1-8 с субъектом или образцом от субъекта.
13. Конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемая соль:



где:

Y выбран из группы, состоящей из  $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ,  $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$ ,  $-O-CR^1R^2-$ ,  $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$  и  $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ;

где  $R^a$  и  $R^b$  являются одинаковыми или разными и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, дейтерия, галогена, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила, алкокси, гидроксид, амино, циано, нитро, гидроксидалкила, циклоалкила и гетероциклила; или  $R^a$  и  $R^b$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

$R^1$  выбран из группы, состоящей из галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксидалкила, гетероциклила, арила и гетероарила;  $R^2$

выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила; или  $R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

или  $R^a$  и  $R^2$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

$m$  представляет собой целое число от 0 до 4;

$n$  равно от 1 до 10;

$L$  представляет собой линкерное звено;

$Pc$  представляет собой антитело против нектин-4 по любому из пп. 1-8.

14. Конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы ( $Pc-L-Y-D$ ) или его фармацевтически приемлемая соль по п. 13, где  $n$  равно от 1 до 8, предпочтительно  $n$  равно от 2 до 8.

15. Конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы ( $Pc-L-Y-D$ ) или его фармацевтически приемлемая соль по п. 13 или 14,

где:

$Y$  представляет собой  $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ;

при этом  $R^a$  и  $R^b$  являются одинаковыми или разными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, дейтерия, галогена и  $C_{1-6}$  алкила;

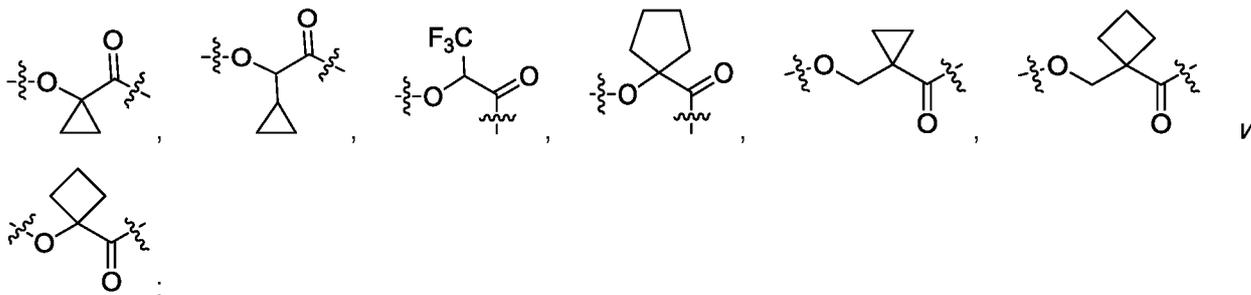
$R^1$  представляет собой  $C_{1-6}$  галогеналкил или  $C_{3-6}$  циклоалкил;

$R^2$  выбран из группы, состоящей из водорода,  $C_{1-6}$  галогеналкила и  $C_{3-6}$  циклоалкила;

или  $R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют  $C_{3-6}$  циклоалкил;

$m$  равно 0 или 1.

16. Конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы ( $Pc-L-Y-D$ ) или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 13-15, где  $Y$  выбран из группы, состоящей из:



при этом O-конец  $Y$  соединен с линкерным звеном  $L$ .

17. Конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 13-16, где линкерное звено -L- представляет собой -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>-L<sup>4</sup>-, где

L<sup>1</sup> выбран из группы, состоящей из -(сукцинимидил-3-ил-*N*)-W-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NR<sup>3</sup>-W-C(O)- и -C(O)-W-C(O)-, где W выбран из группы, состоящей из C<sub>1-6</sub> алкилена и C<sub>1-6</sub> алкилен-C<sub>3-6</sub> циклоалкила, где каждый из C<sub>1-6</sub> алкилена или C<sub>1-6</sub> алкилен-C<sub>3-6</sub> циклоалкила возможно независимо дополнительно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, амина, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> галогеналкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси и C<sub>3-6</sub> циклоалкила;

L<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub><sup>1</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub><sup>1</sup>CH<sub>2</sub>C(O)-, -S(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub><sup>1</sup>C(O)- и химической связи, где p<sup>1</sup> представляет собой целое число от 1 до 20;

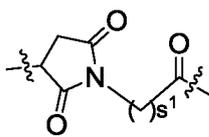
L<sup>3</sup> представляет собой пептидный остаток, состоящий из 2-7 аминокислотных остатков, причем указанные аминокислотные остатки выбраны из группы, состоящей из аминокислотных остатков, образованных из аминокислот фенилаланина, аланина, глицина, валина, лизина, цитруллин, серина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты; и возможно дополнительно замещены одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, амина, алкила, хлоралкила, дейтерированного алкила, алкокси и циклоалкила;

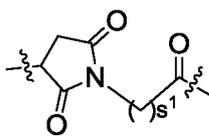
L<sup>4</sup> выбран из группы, состоящей из -NR<sup>5</sup>(CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>)<sub>t</sub>-, -C(O)NR<sup>5</sup>-, -C(O)NR<sup>5</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>- и химической связи, где t представляет собой целое число от 1 до 6;

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> являются одинаковыми или разными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> галогеналкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила и C<sub>1-6</sub> гидроксиалкила;

R<sup>6</sup> и R<sup>7</sup> являются одинаковыми или разными и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> галогеналкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила и C<sub>1-6</sub> гидроксиалкила.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 13-17, где линкерное звено -L- представляет собой -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>-L<sup>4</sup>-, где



L<sup>1</sup> представляет собой , при этом s<sup>1</sup> представляет собой целое число от 2 до 8;

L<sup>2</sup> представляет собой химическую связь;

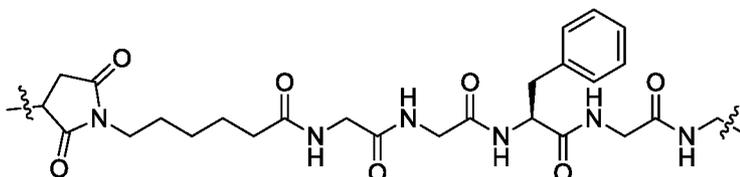
L<sup>3</sup> представляет собой тетрапептидный остаток; предпочтительно

L<sup>4</sup> представляет собой -NR<sup>5</sup>(CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>)<sub>t</sub>-, где R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> и R<sup>7</sup> являются одинаковыми или разными,

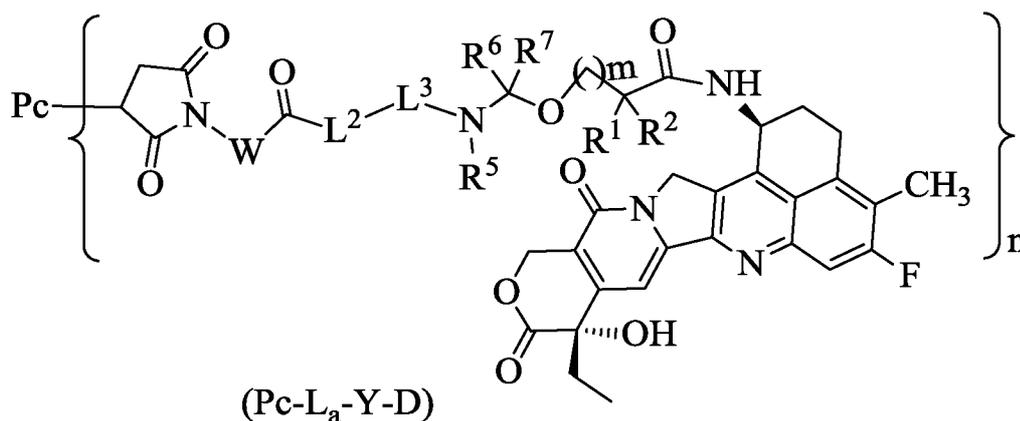
и каждый независимо представляет собой водород или  $C_{1-6}$  алкил, при этом  $t$  равно 1 или 2;

$L^1$ -конец линкера -L- соединен с Pc, а  $L^4$ -конец соединен с Y.

19. Конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 13-18, где -L- представляет собой:



20. Конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемая соль по п. 13, который представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc- $L_a$ -Y-D) или фармацевтически приемлемую соль:



где:

Pc представляет собой антитело против нектина-4 по любому из пп. 1-8;

$m$  представляет собой целое число от 0 до 4;

$n$  равно от 1 до 10;

$R^1$  выбран из группы, состоящей из галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила;  $R^2$  выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила; или  $R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

W выбран из группы, состоящей из  $C_{1-6}$  алкилена и  $C_{1-6}$  алкилен- $C_{3-6}$  циклоалкила, где каждый из  $C_{1-6}$  алкилена и  $C_{1-6}$  алкилен- $C_{3-6}$  циклоалкила возможно независимо дополнительно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксильной, циано, амино, алкила, хлоралкила, дейтерированного

алкила, алкокси и циклоалкила;

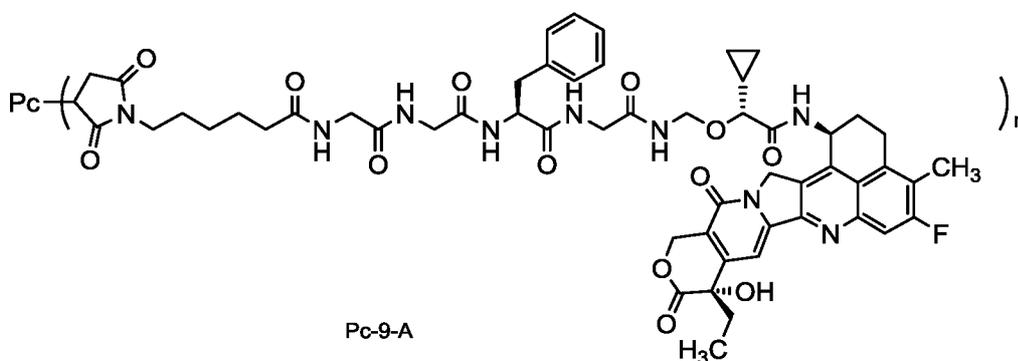
$L^2$  выбран из группы, состоящей из  $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)-$ ,  $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ ,  $-S(CH_2)p^1C(O)-$  и химической связи, при этом  $p^1$  представляет собой целое число от 1 до 20;

$L^3$  представляет собой пептидный остаток, состоящий из 2-7 аминокислотных остатков, причем указанные аминокислотные остатки выбраны из группы, состоящей из аминокислотных остатков, образованных из аминокислот фенилаланина, аланина, глицина, валина, лизина, цитруллина, серина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, и возможно дополнительно замещены одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксигруппы, циано, аминной, алкильной, хлоралкильной, дейтерированной алкильной, алкокси и циклоалкильной;

$R^5$  выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила и гидроксиалкила;

$R^6$  и  $R^7$  являются одинаковыми или разными и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила и гидроксиалкила.

21. Конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 13-20, где указанный конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой:



где:

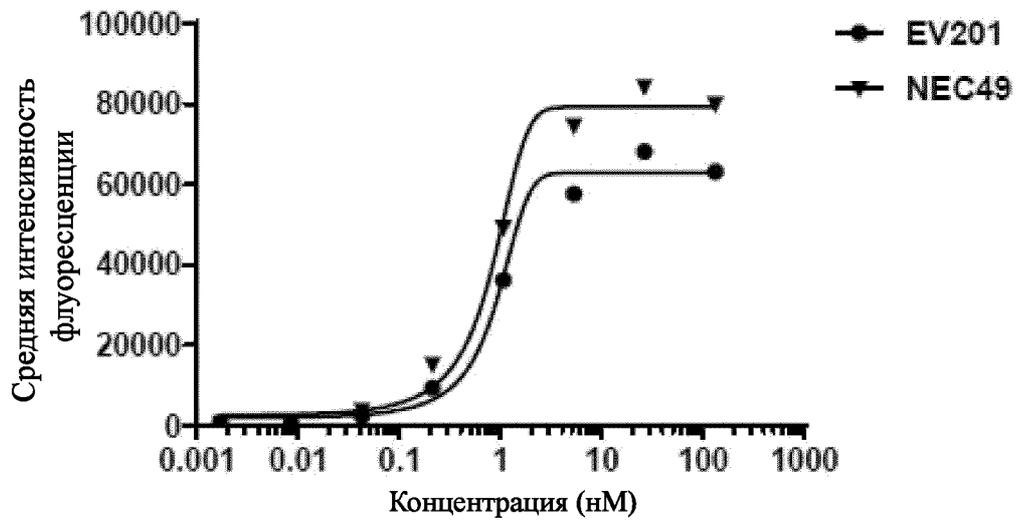
$n$  равно от 1 до 8;

Pc представляет собой антитело против нектина-4, содержащее тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 22.

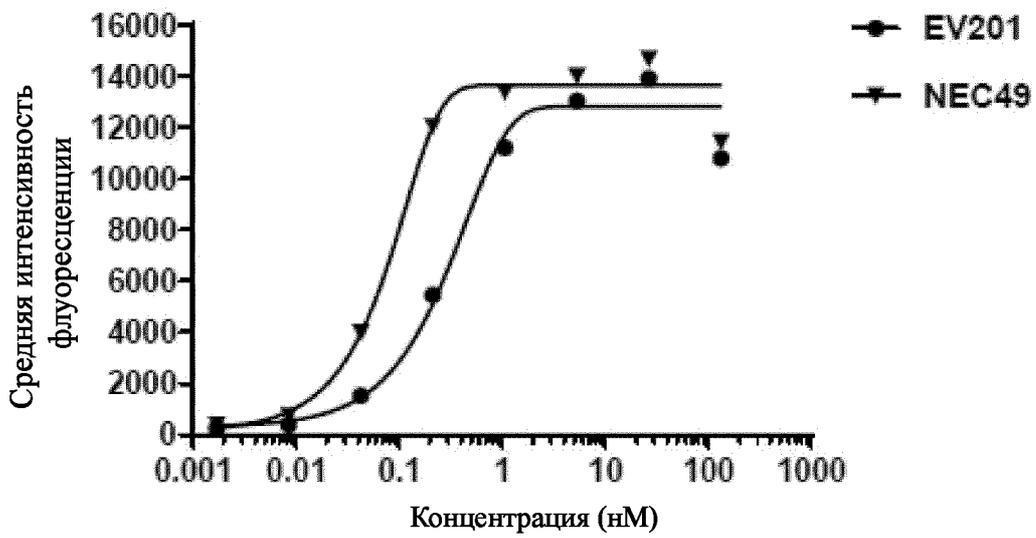
22. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против нектина-4 по любому из пп. 1-8, или молекулу нуклеиновой кислоты по п. 9, или конъюгат антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемую соль по любому из пп. 13-21, и один или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, разбавителей или носителей.

23. Применение антитела против нектина-4 по любому из пп. 1-8 или молекулы нуклеиновой кислоты по п. 9, или конъюгата антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 13-21, или фармацевтической композиции по п. 22 для получения лекарственного средства для лечения опосредованного нектином-4 заболевания или расстройства.
24. Применение антитела против нектина-4 по любому из пп. 1-8 или молекулы нуклеиновой кислоты по п. 9, или конъюгата антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 13-21, или фармацевтической композиции по п. 22 для получения лекарственного средства для лечения и/или предупреждения вируса, опухоли или рака, где предпочтительно опухоль или рак выбраны из группы, состоящей из рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака пищевода, немелкоклеточного рака легкого, опухолей гортани, опухолей глотки, опухолей полости рта, рака желудка, рака яичников, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака головы и шеи, плоскоклеточного рака и меланомы.
25. Набор, содержащий антитело против нектина-4 по любому из пп. 1-8 или молекулу нуклеиновой кислоты по п. 9, или конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемую соль по любому из пп. 13-21, или фармацевтическую композицию по п. 22.

1

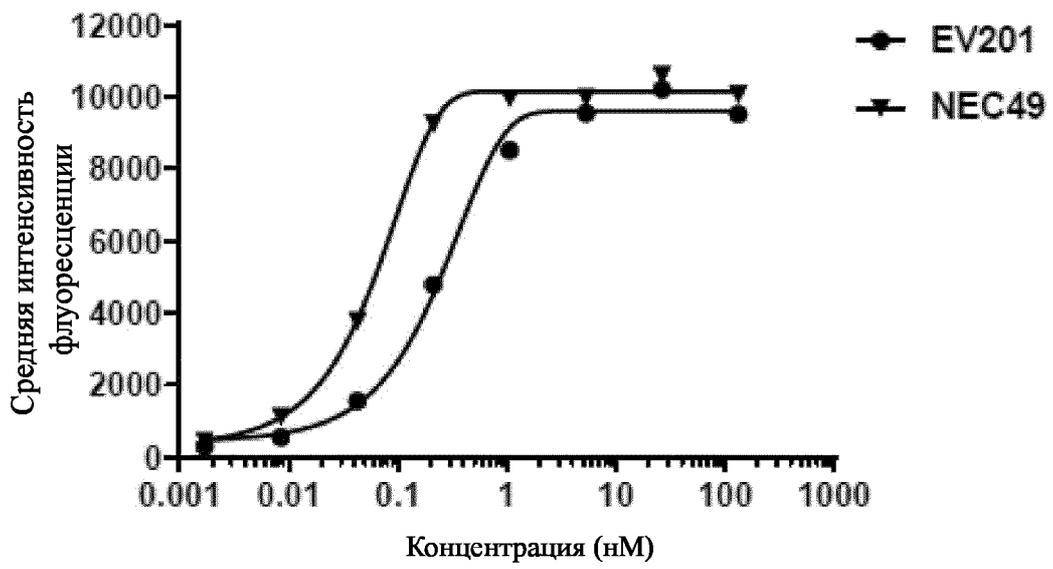


ФИГ. 1

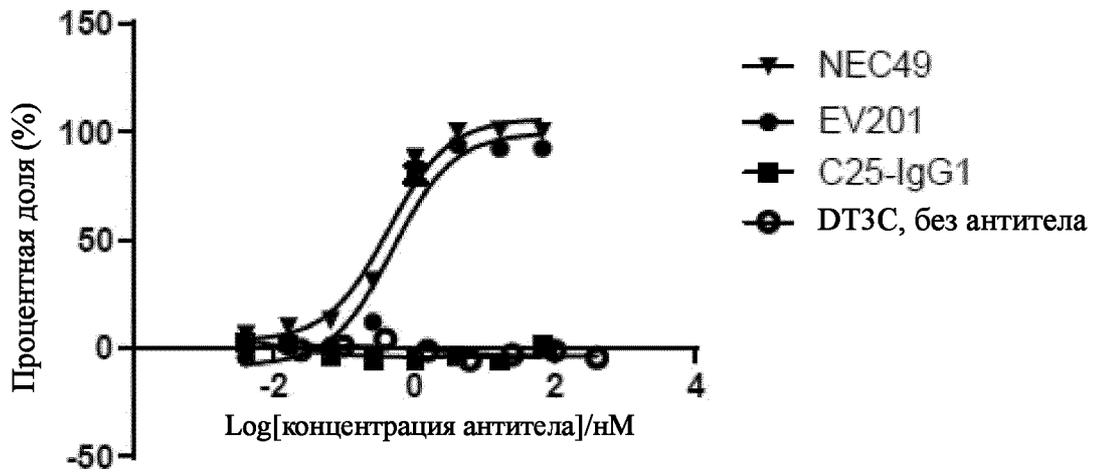


ФИГ. 2

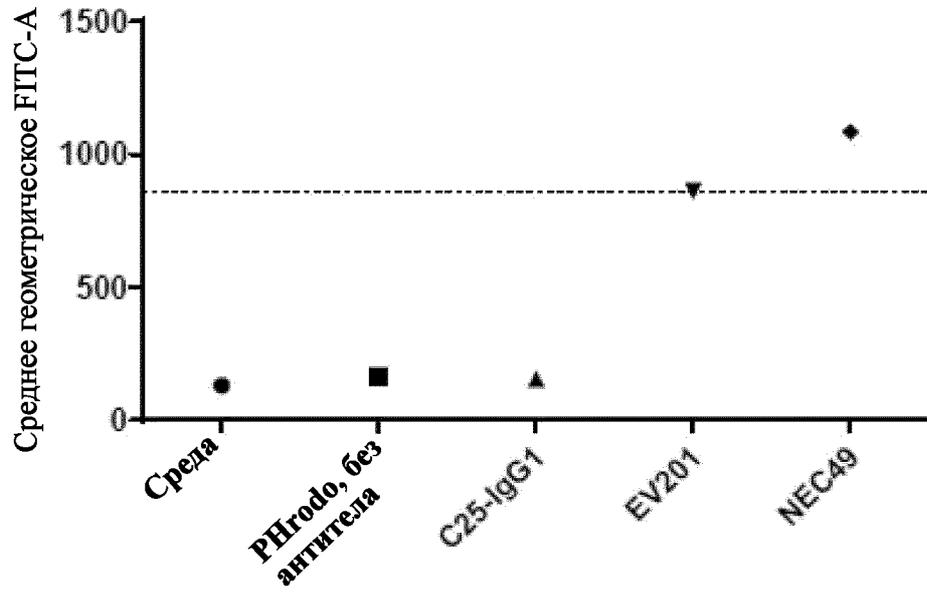
2



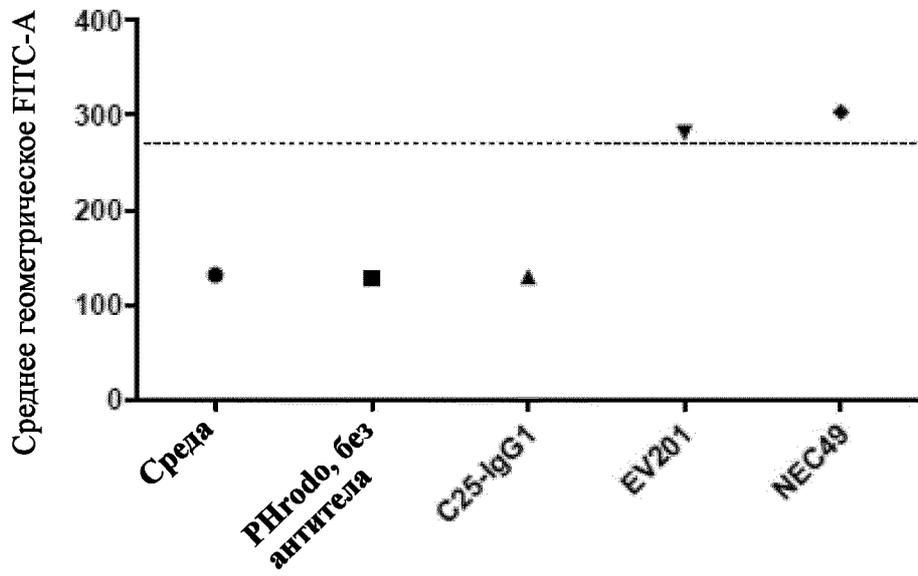
ФИГ. 3



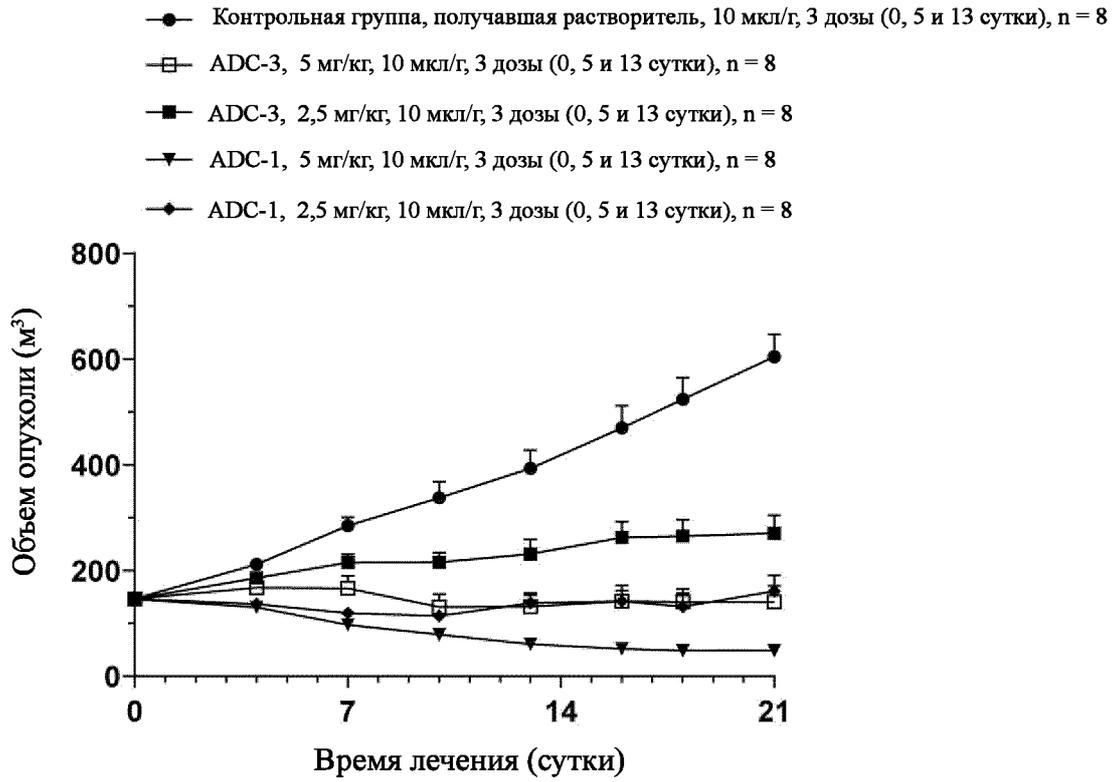
ФИГ. 4



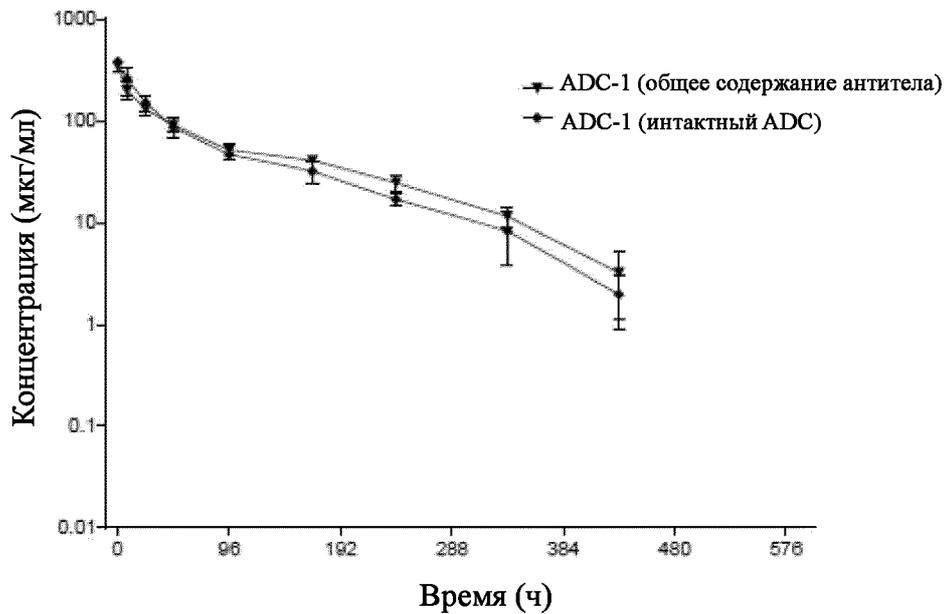
ФИГ. 5А



ФИГ. 5В



ФИГ. 6



ФИГ. 7