

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490510 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.05.30

(22) Дата подачи заявки  
2022.08.19

(51) Int. Cl. *C12N 15/117* (2010.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 47/64* (2017.01)  
*A61K 47/68* (2017.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К НЕКТИНУ-4 И КОНЬЮГАТЫ

(31) 63/235,656; 63/236,809; 63/255,318

(32) 2021.08.20; 2021.08.25; 2021.10.13

(33) US

(86) PCT/US2022/075236

(87) WO 2023/023659 2023.02.23

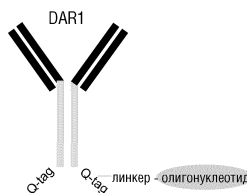
(71) Заявитель:  
ТАЛЛАК ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)

(72) Изобретатель:  
Строп Павел, Ан Минжуй, Коста  
Мария Хосе да Сильва Тейсейра,  
Вань Хун Ирис, Бонакорси Мая  
Зуквич, Чен Эми Шоу-Ру, Сим Банг  
Джанет, Ли Минь, Ко Трэйси Чиа-  
Чизнь, Сангалэнг Эмма Рут Б. (US)

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

(57) Настоящее изобретение обеспечивает антитела к нектину-4 и их конъюгаты с олигонуклеотидами. Также обеспечиваются соответствующие способы их получения и способы их применения, включая терапевтические применения.

Сконструированный Q-tag



202490510  
A1

202490510  
A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580301EA/081

### АНТИТЕЛА К НЕКТИНУ-4 И КОНЬЮГАТЫ

#### Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета согласно предварительной патентной заявке США с серийным № 63/235656, поданной 20 августа 2021 г., предварительной патентной заявке США с серийным № 63/236809, поданной 25 августа 2021 г., и предварительной патентной заявке США с серийным № 63/255318, поданной 13 октября 2021 г., содержание каждой из которых включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для всех целей.

#### Ссылка на представленный в электронном виде перечень последовательностей

[0002] Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей (186492000640seqlist.xml; размер: 1316058 байтов; и дата создания: 19 августа 2022 г.) включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте.

#### Область, к которой относится изобретение

[0003] Настоящее изобретение относится к антителам к нектину-4 и их конъюгатам, а также к их применению, включая терапевтические применения.

#### Предпосылки создания изобретения

[0004] Молекула клеточной адгезии нектина 4 (Gene ID 81607; UniProt primary accession Q96NY8; известная как нектин-4, PVRL4, LNIR, PRR4) представляет собой трансмембранный белок типа I семейства нектининов (которое включает нектин-1, нектин-2, нектин -3 и нектин-4). Нектин-4 был идентифицирован в ходе биоинформационного скрининга на последовательности, сходные с эктодоменом нектина (Reymond et al., *Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction*, J. Biol. Chem. 2001 Nov 16;276(46):43205-15). Белок содержит два иммуноглобулин-подобных (Ig-подобных) домена C2-типа и один Ig-подобный домен V-типа (IgV). Семейство нектининов регулирует различные клеточные функции, такие как пролиферация, дифференцировка и миграция (Miyoshi and Takai, *Nectin and nectin-like molecules: biology and pathology*, Am. J. Nephrol. 2007;27(6):590-604). В частности, нектинины представляют собой молекулы клеточной адгезии, которые участвуют в адгезионных соединениях и плотных соединениях между различными типами клеток. Также было показано, что нектин-4 способствует независимости фиксации, обеспечивая прикрепление клетка-к-клетке и независимость от матрикса (Pavlova et al., *A role for PVRL4-driven cell-cell interactions in tumorigenesis*, eLife 2013;2:e00358). Сообщалось, что нектин-4 имеет гомофильное взаимодействие с самим собой и гетерофильное взаимодействие с нектином-1 (Samanta and Almo, *Nectin family of cell-adhesion molecules: structural and molecular aspects of function and specificity*, Cell Mol. Life Sci. 2015 Feb;72(4):645-58). Растворимая форма нектина-4 образуется в результате протеолитического расщепления металлопротеиназами ADAM10/17 и потенциально

может иметь функцию прогностического маркера.

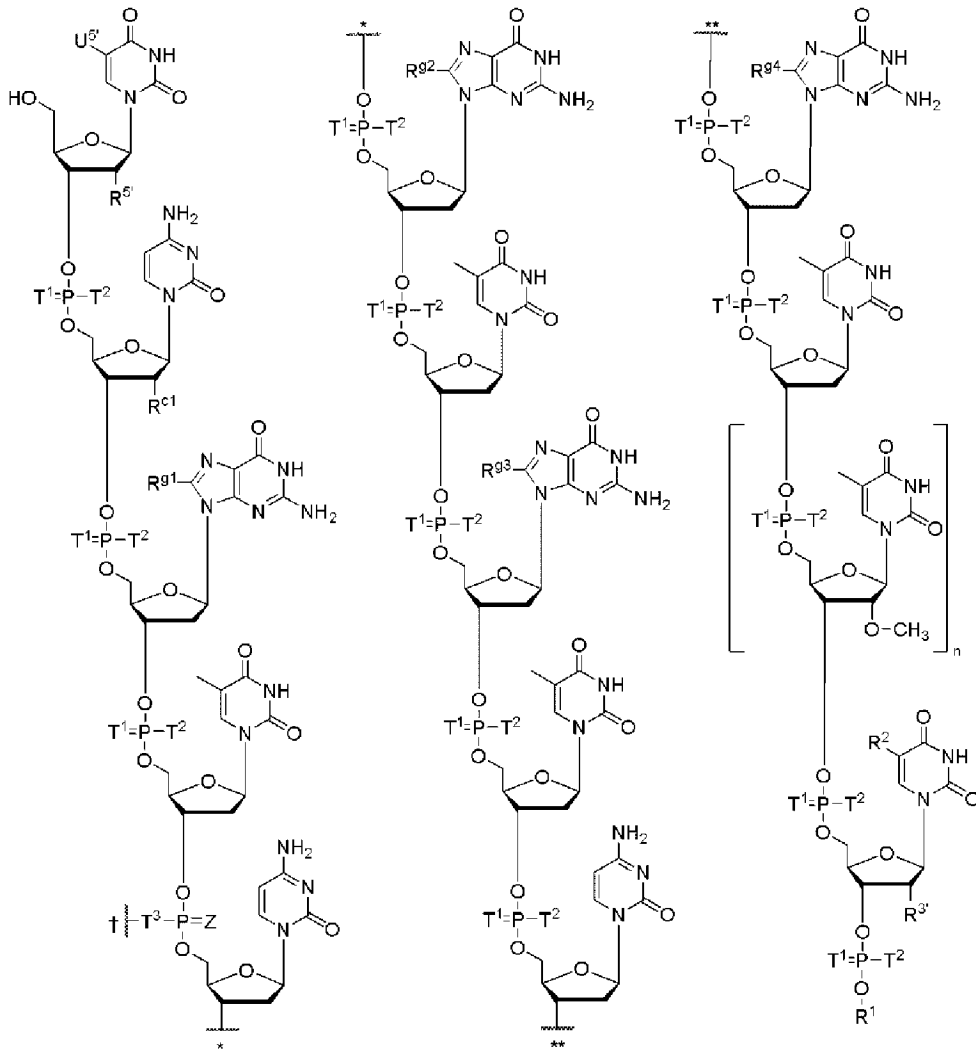
[0005] Нектин-4 представляет собой опухоль-ассоциированный белок, сверхэкспрессия которого наблюдается при раке пищевода, раке желудка, раке мочевого пузыря, раке печени, раке поджелудочной железы, раке яичников, раке молочной железы, раке толстой кишки, раке желчного пузыря и раке легких. Аберрантную экспрессию в опухолях связывают со стимулированием пролиферации и метастазирования. Сверхэкспрессия нектина-4 также связана с плохим прогнозом при многих типах опухолей. В нормальных тканях человека экспрессия первоначально ограничивается эмбрионом и плацентой, но уровень экспрессии нектина-4 от слабого до среднего обнаруживается в коже, пищеводе, молочной железе, слизистой оболочке полости рта, мочевом пузыре, плаценте и миндалинах (атлас белков).

[0006] Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) представляют собой молекулы, связанные с различными патогенами и распознаваемые toll-подобными рецепторами (TLR) и другими паттерн-распознающими рецепторами (PRR), активирующими врожденные иммунные ответы. Способность PAMP рекрутировать иммунную систему в отсутствие патогенов обеспечивает стратегию лечения различных заболеваний, связанного с разрушением клеток (например, противораковая терапия), посредством использования врожденного иммунного ответа. Одним из классов PAMP, который был исследован для различных терапевтических применений, являются иммуностимулирующие олигонуклеотиды, такие как содержащие неметилированный цитозин-гуанидинуклеотид (CpG) олигодезоксинуклеотиды (CpG ODN) (например, агатолимод). Считается, что CpG ODN опосредуют димеризацию TLR9 в иммунных клетках (например, В-клетках, моноцитах и плазматоцитидных дендритных клетках (pDC)) для активации цитокинов (например, интерферона I типа и интерлейкинов), тем самым активируя естественные клетки-киллеры.

[0007] Toll-подобный рецептор 9 (TLR9), также обозначаемый как CD289, является важным рецептором, экспрессируемым в клетках иммунной системы, включая дендритные клетки (DC), В-лимфоциты, макрофаги, естественные клетки-киллеры и другие антигенпрезентирующие клетки. Активация TLR9 запускает внутриклеточные сигнальные каскады, что приводит к активации, созреванию, пролиферации и продукции цитокинов в этих иммунных клетках, таким образом соединяя врожденный и адаптивный иммунитет. Martinez-Campos *et al.*, *Viral Immunol.* 2016, 30, 98-105; Notley *et al.*, *Sci. Rep.* 2017, 7, 42204. Природные агонисты TLR-9 включают неметилированный цитозин-гуанидинуклеотид (CpG)-содержащие олигодезоксинуклеотиды (CpG ODN).

[0008] CpG ODN могут включать, например, олигодезоксинуклеотиды, содержащие поли-G хвосты с фосфоротиоатными остовами на 3'- и 5'-концах и центральную палиндромную последовательность, включающую фосфатный остов и CpG в его центральной палиндромной последовательности, или олигодезоксинуклеотиды, имеющие полностью фосфоротиоатный остов и последовательность на 5'-конце для активации TLR9, или олигодезоксинуклеотиды, имеющие полностью фосфоротиоатный



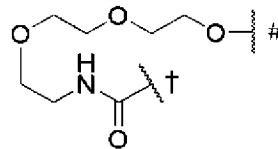


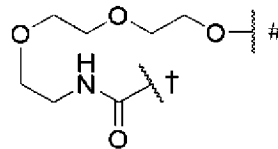
где

~~~~ \* и ~~~~ \*\* указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где ~~~~ † указывает точку присоединения к линкеру L;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T^2$  представляет собой S<sup>-</sup>;



$T^3$  представляет собой группу , где ~~~~ † указывает точку присоединения к L, и где ~~~~ # указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$  представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой H;

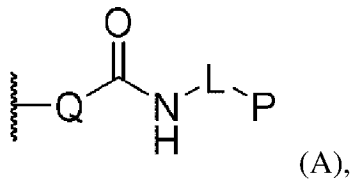
$R^3$  представляет собой метокси;

$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

$R^2$  представляет собой  $-H$  или метил; и

$n$  представляет собой целое число от 0 до 2.

[0011] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)

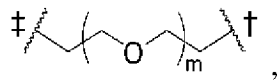


где:

$\sim$  указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

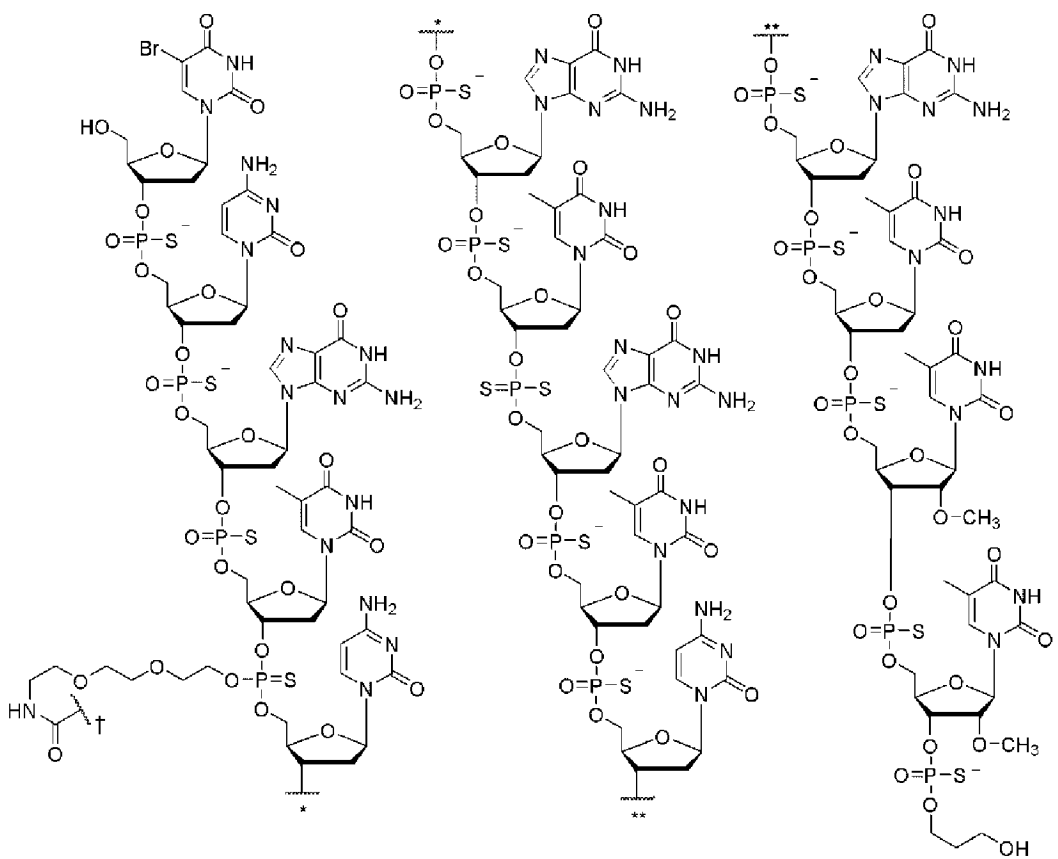
каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



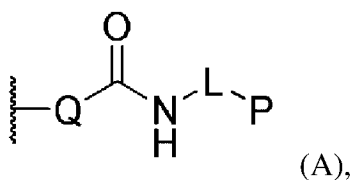
где  $m$  представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где  $\sim †$  указывает точку присоединения к P, и  $\sim ‡$  указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



где  $\sim$  \* и  $\sim$  \*\* указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где  $\sim$  † указывает точку присоединения к линкеру L.

[0012] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)

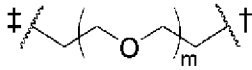


где:

$\sim$  указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

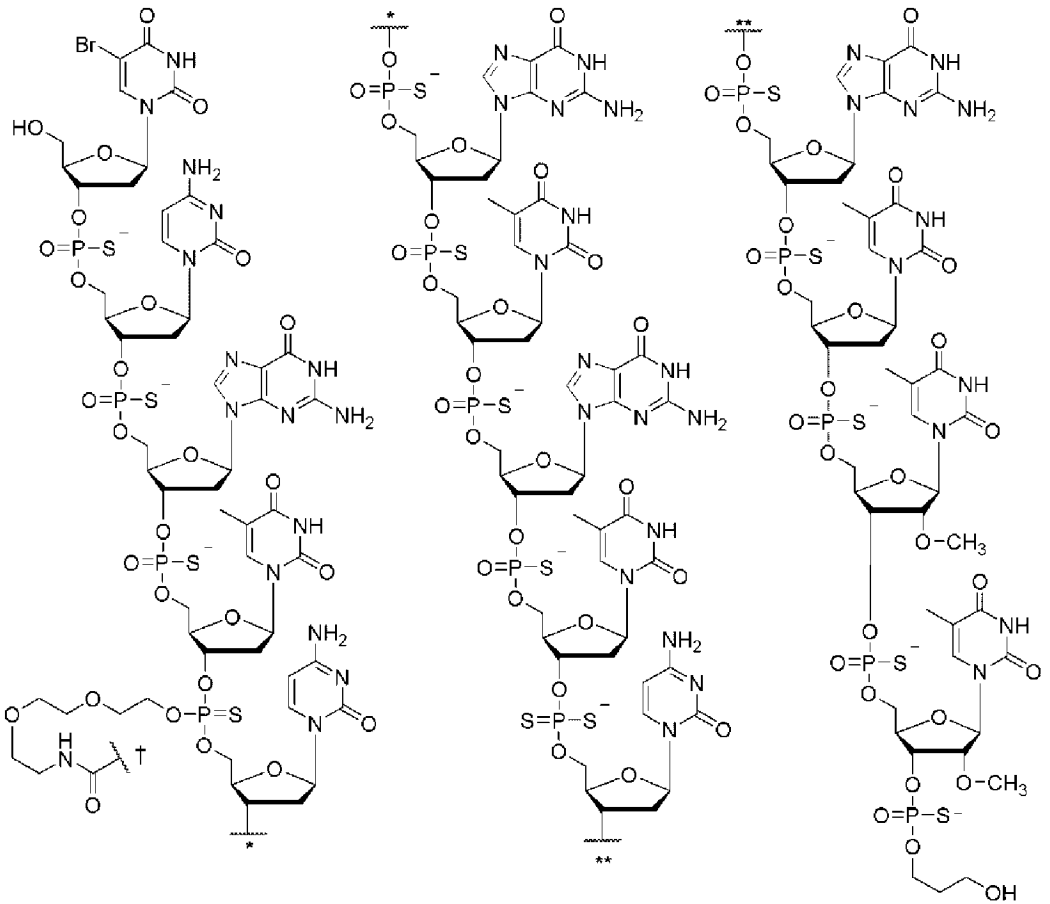
каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



где  $m$  представляет собой целое число, имеющее значение от около 0 до около 50 (например, от около 0 до около 10, от около 0 до около 30, от около 10 до около 30, от около 20 до около 30 и значения в промежутках между ними), и где  $\sim \dagger$  указывает точку присоединения к Р, и  $\sim \ddagger$  указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый Р независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, включающий структуру



где  $\sim *$  и  $\sim **$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где  $\sim \dagger$  указывает точку присоединения к линкеру L.

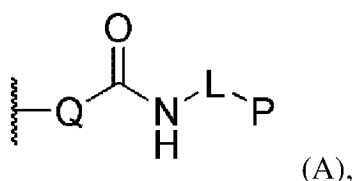
[0013] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P),

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), которые включают аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47),

и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид (P) связан с Q-tag пептидом



через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A):



где  $\text{---}$  указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab).

[0014] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается конъюгат, включающий антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело включает две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела, и два Q-tag пептида, каждый из которых включает пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47); где каждый из Q-tag пептидов связан с С-концом одной из тяжелых цепей антитела; и где по меньшей мере один из Q-tag пептидов связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом (P) через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано на Фиг. 9А или Фиг. 9В.

[0015] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается конъюгат, включающий антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab), по меньшей мере одну пептидную последовательность Q-tag, включающую глутаминовый остаток, и по меньшей мере один иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где пептидная последовательность Q-tag является природной или синтетической, и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag через амидную связь с глутаминовым остатком и линкер (L), где по меньшей мере одна пептидная последовательность Q-tag выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:39-55.

[0016] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата включает домен, представляющий собой вариабельную область легкой цепи (VL), и домен, представляющий собой вариабельную область тяжелой цепи (VH), где:

(a) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942 и 944, и VH-домен включает последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943 и 945;

(b) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:248, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:249;

(c) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:250, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена





домена SEQ ID NO:932., и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:933;

(ee) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:934, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:935;

(ff) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:936, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:937;

(gg) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:938, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:939;

(hh) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:940, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:941;

(ii) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:942, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:943; или

(jj) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:944, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:945.

[0017] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата включает домен, представляющий собой переменную область тяжелой цепи (VH), и домен, представляющий собой переменную область легкой цепи (VL), где:

(a) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:275, CDR-H2 включает SEQ ID NO:276, CDR-H3 включает SEQ ID NO:277, CDR-L1 включает SEQ ID NO:272, CDR-L2 включает SEQ ID NO:273 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:274;

(b) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:293, CDR-H2 включает SEQ ID NO:294, CDR-H3 включает SEQ ID NO:295, CDR-L1 включает SEQ ID NO:290, CDR-L2 включает SEQ ID NO:291 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:292;

(c) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:311, CDR-H2 включает SEQ ID NO:312, CDR-H3 включает SEQ ID NO:313, CDR-L1 включает SEQ ID NO:308, CDR-L2 включает SEQ ID NO:309 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:310;

(d) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:329, CDR-H2 включает SEQ ID NO:330, CDR-H3 включает SEQ ID NO:331, CDR-L1 включает SEQ ID NO:326, CDR-L2 включает SEQ ID NO:327 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:328;

(e) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-

L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:347, CDR-H2 включает SEQ ID NO:348, CDR-H3 включает SEQ ID NO:349, CDR-L1 включает SEQ ID NO:344, CDR-L2 включает SEQ ID NO:345 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:346;

(f) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:365, CDR-H2 включает SEQ ID NO:366, CDR-H3 включает SEQ ID NO:367, CDR-L1 включает SEQ ID NO:362, CDR-L2 включает SEQ ID NO:363 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:364;

(g) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:383, CDR-H2 включает SEQ ID NO:384, CDR-H3 включает SEQ ID NO:385, CDR-L1 включает SEQ ID NO:380, CDR-L2 включает SEQ ID NO:381 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:382;

(h) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:401, CDR-H2 включает SEQ ID NO:402, CDR-H3 включает SEQ ID NO:403, CDR-L1 включает SEQ ID NO:398, CDR-L2 включает SEQ ID NO:399 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:400;

(i) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:419, CDR-H2 включает SEQ ID NO:420, CDR-H3 включает SEQ ID NO:421, CDR-L1 включает SEQ ID NO:416, CDR-L2 включает SEQ ID NO:417 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:418;

(j) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:437, CDR-H2 включает SEQ ID NO:438, CDR-H3 включает SEQ ID NO:439, CDR-L1 включает SEQ ID NO:434, CDR-L2 включает SEQ ID NO:435 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:436;

(k) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:455, CDR-H2 включает SEQ ID NO:456, CDR-H3 включает SEQ ID NO:457, CDR-L1 включает SEQ ID NO:452, CDR-L2 включает SEQ ID NO:453 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:454;

(l) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:281, CDR-H2 включает SEQ ID NO:282, CDR-H3 включает SEQ ID NO:283, CDR-L1 включает SEQ ID NO:278, CDR-L2 включает SEQ ID NO:279 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:280;

(m) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:299, CDR-H2 включает SEQ ID NO:300, CDR-H3 включает SEQ ID NO:301, CDR-L1 включает SEQ ID NO:296, CDR-L2 включает SEQ ID NO:297 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:298;

(n) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:317, CDR-H2 включает SEQ ID NO:318, CDR-H3 включает SEQ ID NO:319, CDR-L1 включает SEQ ID NO:314, CDR-L2 включает SEQ ID NO:315 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:316;

(o) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-





L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:485, CDR-H2 включает SEQ ID NO:486, CDR-H3 включает SEQ ID NO:487, CDR-L1 включает SEQ ID NO:482, CDR-L2 включает SEQ ID NO:483 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:484;

(jj) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:473, CDR-H2 включает SEQ ID NO:474, CDR-H3 включает SEQ ID NO:475, CDR-L1 включает SEQ ID NO:470, CDR-L2 включает SEQ ID NO:471 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:472;

(kk) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:562, CDR-L2 включает SEQ ID NO:563 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:564, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:565, CDR-H2 включает SEQ ID NO:566 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:567;

(ll) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:580, CDR-L2 включает SEQ ID NO:581 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:582, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:583, CDR-H2 включает SEQ ID NO:584 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:585;

(mm) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:598, CDR-L2 включает SEQ ID NO:599 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:600, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:601, CDR-H2 включает SEQ ID NO:602 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:603;

(nn) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:616, CDR-L2 включает SEQ ID NO:617 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:618, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:619, CDR-H2 включает SEQ ID NO:620 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:621;

(oo) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:634, CDR-L2 включает SEQ ID NO:635 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:636, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:637, CDR-H2 включает SEQ ID NO:638 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:639;

(pp) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:652, CDR-L2 включает SEQ ID NO:653 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:654, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:655, CDR-H2 включает SEQ ID NO:656 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:657;

(qq) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:670, CDR-L2 включает SEQ ID NO:671 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:672, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:673, CDR-H2 включает SEQ ID NO:674 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:675;

(rr) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:688, CDR-L2 включает SEQ ID NO:689 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:690, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:691, CDR-H2 включает SEQ ID NO:692 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:693;

(ss) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-



H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:706, CDR-L2 включает SEQ ID NO:707 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:708, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:709, CDR-H2 включает SEQ ID NO:710 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:711;

(tt) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:724, CDR-L2 включает SEQ ID NO:725 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:726, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:727, CDR-H2 включает SEQ ID NO:728 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:729;

(uu) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:742, CDR-L2 включает SEQ ID NO:743 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:744, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:745, CDR-H2 включает SEQ ID NO:746 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:747;

(vv) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:760, CDR-L2 включает SEQ ID NO:761 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:762, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:763, CDR-H2 включает SEQ ID NO:764 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:765;

(ww) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:778, CDR-L2 включает SEQ ID NO:779 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:780, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:781, CDR-H2 включает SEQ ID NO:782 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:783;

(xx) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:796, CDR-L2 включает SEQ ID NO:797 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:798, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:799, CDR-H2 включает SEQ ID NO:800 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:801;

(yy) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:814, CDR-L2 включает SEQ ID NO:815 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:816, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:817, CDR-H2 включает SEQ ID NO:818 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:819; или

(zz) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:832, CDR-L2 включает SEQ ID NO:833 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:834, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:835, CDR-H2 включает SEQ ID NO:836 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:837.

[0018] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата включает домен, представляющий собой переменную область легкой цепи (VL), и домен, представляющий собой переменную область тяжелой цепи (VH), где:

(a) VH-домен включает последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943 и 945, и/или VL-домен включает последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936,



включает последовательность SEQ ID NO:915;

(v) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:916 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:917;

(w) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:918 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:919;

(x) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:920 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:921;

(y) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:922 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:923;

(z) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:924 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:925;

(aa) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:926 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:927;

(bb) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:928 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:929;

(cc) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:930 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:931;

(dd) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:932 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:933;

(ee) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:934 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:935;

(ff) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:936 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:937;

(gg) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:938 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:939;

(hh) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:940 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:941;

(ii) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:942 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:943; или

(jj) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:944 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:945.

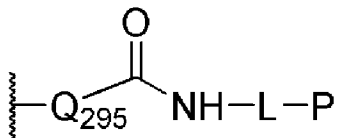
[0019] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата представляет собой Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab'-SH, Fv, scFv, однодоменное, содержащее только одну тяжелую цепь или содержащее только одну легкую цепь антитела, или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата представляет собой гуманизированное, человеческое или химерное антитело, или его фрагмент.

[0020] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата включает Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой

человеческую Fc-область, выбранную из группы, состоящей из Fc-области IgG1, Fc-области IgG2 и Fc-области IgG4. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые уменьшают связывание с C1q. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые повышают связывание с C1q. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, демонстрирующую активность дикого типа, связанную с активацией комплемента. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые повышают активацию комплемента. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают эффекторную функцию, по сравнению с человеческой Fc-областью, которая не содержит аминокислотную замену(замены). В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой: (a) Fc-область IgG1 человека, включающую замены L234A, L235A и/или G237A, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом; (b) Fc-область IgG2 человека, включающую замены A330S и/или P331S, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом; или (c) Fc-область IgG4 человека, включающую замены S228P и/или L235E, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-область сконструирована так, чтобы улучшить эффекторную функцию, необязательно при этом улучшенная эффекторная функция представляет собой антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC активность), антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP активность) или комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC активность). В некоторых вариантах осуществления Fc-область сконструирована как обладающая по меньшей мере двумя характерными свойствами, выбранными из группы, состоящей из улучшенной ADCC активности, улучшенной ADCP активности и улучшенной CDC активности. В некоторых вариантах осуществления Fc-область включает замену G236A, где аминокислотное положение указано в соответствии с EU-индексом. В некоторых вариантах осуществления Fc-область включает замену G236A, где аминокислотное положение указано в соответствии с EU-индексом, и Fc-область является нефукозилированной. В некоторых вариантах осуществления Fc-область была сконструирована для улучшения ADCC активности. В некоторых вариантах осуществления Fc-область сконструирована так, чтобы улучшить ADCP активность. В некоторых вариантах осуществления Fc-область сконструирована так, чтобы улучшить CDC активность. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата включает по меньшей мере одну аминокислотную

замену в Fc-области, которая улучшает ADCC активность. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает ADCP активность. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает CDC активность. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна или по меньшей мере две из тяжелых цепей антитела конъюгата является/являются нефукозиллированными. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата получают в клеточной линии с нокаутом альфа1,6-фукозилтрансферазы (Fut8) или в клеточной линии, сверхэкспрессирующей  $\beta$ 1,4-N-ацетилгликозилминилтрансферазу III (GnT-III), при этом клеточная линия необязательно представляет собой клеточную линию CHO. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата получают в системе экспрессии в присутствии соединения 2-фторфукозы или производного 5-алкинилфукозы. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия сверхэкспрессирует  $\mu$ -маннозидазу Гольджи II (ManII), при этом клеточная линия необязательно представляет собой клеточную линию CHO. В некоторых вариантах осуществления Fc-область включает замену N297A, где нумерация аминокислотного положения приведена в соответствии с EU-индексом. В некоторых вариантах осуществления Fc-область включает замену D265A, где нумерация аминокислотного положения приведена в соответствии с EU-индексом.

[0021] В некоторых вариантах осуществления конъюгат также включает иммуномодулирующий олигонуклеотид P, присоединенный к Q295 остатка Fc-области, как показано в следующей формуле



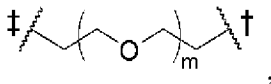
где L представляет собой линкерную группу, связанную с Q295 Fc-области через амидную связь.

[0022] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата включает константный домен тяжелой цепи антитела, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:92-107, 111,112, 178 и 494-497. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата включает человеческую легкую цепь лямбда. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата включает человеческую легкую цепь каппа. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата включает константный домен легкой цепи антитела, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:108-110. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата включает две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, и при этом один Q-tag присоединен к одной или обоим тяжелым цепям антитела. В некоторых вариантах осуществления Q-tag слит с C-концом тяжелой цепи антитела(антител). В некоторых

вариантах осуществления антители конъюгата включает две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, и при этом один Q-tag присоединен к одной или обоим легким цепям антитела. В некоторых вариантах осуществления Q-tag находится в Fc-домене.

[0023] В некоторых вариантах осуществления конъюгат индуцирует активацию TLR9. В некоторых вариантах осуществления каждый Q-tag независимо включает пептидную последовательность, включающую от 5 до 15 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления Q-tag имеет природное происхождение. В некоторых вариантах осуществления пептидная последовательность каждого Q-tag независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-55. В некоторых вариантах осуществления Q-tag включает пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47). В некоторых вариантах осуществления каждый Q-tag независимо включает RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQGFPP (SEQ ID NO:48) или RPQGFPP (SEQ ID NO:49). В некоторых вариантах осуществления каждый Q-tag независимо включает RPQGFPP (SEQ ID NO:49). В некоторых вариантах осуществления 1 или 2 Q-tag связан/связаны с антителом. В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет значение DAR 1 или 2.

[0024] В некоторых вариантах осуществления линкер L включает полиэтиленгликолевый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления линкер L представляет собой

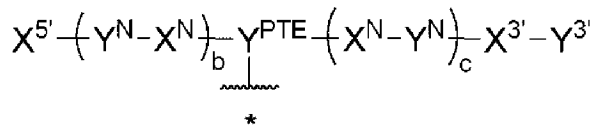


где  $m$  представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где  $\sim\sim\sim \dagger$  указывает точку присоединения к  $T^3$ , и  $\sim\sim\sim \dagger$  указывает точку присоединения к остальной части конъюгата.

[0025] В некоторых вариантах осуществления  $m$  имеет значение от около 20 до около 30. В некоторых вариантах осуществления где  $m$  имеет значение около 24. В некоторых вариантах осуществления  $Z$  представляет собой  $S$ . В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид  $P$  включает по меньшей мере одну пару геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S^-$ . В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 3. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 5. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении

нуклеозидного остатка 6. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 7. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 8. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 9. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 10. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 11. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 12. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 13. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 14. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 15. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид Р включает по меньшей мере две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S<sup>-</sup>. В некоторых вариантах осуществления  $R^{5'}$  представляет собой Н. В некоторых вариантах осуществления  $R^{5'}$  представляет собой метокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^{c1}$  представляет собой Н. В некоторых вариантах осуществления  $R^{c1}$  представляет собой метокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой метил. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой Н. В некоторых вариантах осуществления  $U^{5'}$  представляет собой бром. В некоторых вариантах осуществления  $U^{5'}$  представляет собой -Н. В некоторых вариантах осуществления  $m$  представляет собой целое число от 20 до 25. В некоторых вариантах осуществления  $m$  имеет значение 24.

[0026] В некоторых вариантах осуществления каждый Р независимо включает олигонуклеотид, выбранный из Таблицы 2, Таблицы 3 и Таблицы 4. В некоторых вариантах осуществления каждый (L) и (P) в конъюгате независимо включает структуру, выбранную из Таблицы 2, Таблицы 5 и Таблицы 6, необязательно соединение 7.6b или соединение 7.7b. В некоторых вариантах осуществления каждый (P) и (L) в конъюгате независимо включает олигонуклеотид или модифицированный олигонуклеотид, выбранный из SEQ ID NO: 1-38 и 129-166. В некоторых вариантах осуществления каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид Р независимо представляет собой

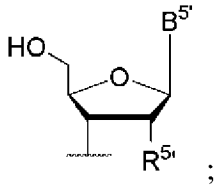


где

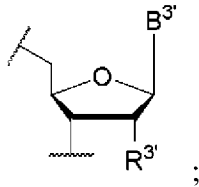
$b$  и  $c$  каждый независимо представляет собой целое число от 1 до 25; при условии, что сумма  $b$  и  $c$  равна по меньшей мере 5;

$\text{---}^*$  указывает точку присоединения иммуномодулирующего олигонуклеотида  $P$  к остальной части конъюгата;

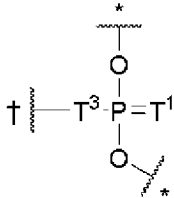
$X^{5'}$  представляет собой 5'-концевой нуклеозид, включающий структуру



$X^{3'}$  представляет собой 3'-концевой нуклеозид, включающий структуру

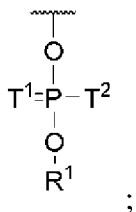


$Y^{PTE}$  представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир, включающий

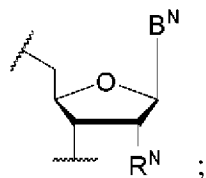


структуру  $\text{---}^*$ , где  $*$  указывает точки присоединения к остальной части олигонуклеотида и  $\text{---}^\dagger$  указывает точку присоединения к линкеру  $L$ , или, если  $L$  отсутствует,  $\text{---}^\dagger$  указывает точку присоединения к Q-tag пептиду на глутаминовом остатке через амидную связь;

$Y^{3'}$  представляет собой концевой фосфотриэфир, включающий структуру

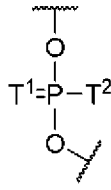


каждый  $X^N$  независимо представляет собой нуклеозид, включающий структуру





каждый  $Y^N$  независимо представляет собой межнуклеозидный линкер,



включающий структуру ;

где каждый  $B^N$  независимо представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеоснование;

каждый  $R^N$  независимо представляет собой -H или -O-C<sub>1-4</sub>-алкил, где C<sub>1-4</sub>-алкил из -O-C<sub>1-4</sub>-алкила необязательно дополнительно замещен -O-C<sub>1-4</sub>-алкилом;

$B^{5'}$  и  $B^{3'}$  независимо представляют собой модифицированное или немодифицированное нуклеоснование;

$R^{5'}$  и  $R^{3'}$  независимо представляют собой -H или -O-C<sub>1-4</sub>-алкил, где C<sub>1-4</sub>-алкил из -O-C<sub>1-4</sub>-алкила необязательно дополнительно замещен -O-C<sub>1-4</sub>-алкилом;

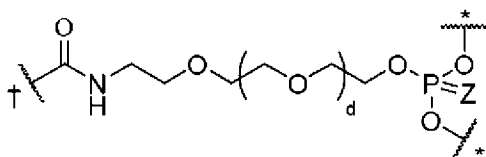
каждый  $T_1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T_2$  независимо представляет собой O<sup>-</sup> или S<sup>-</sup>; и

$T_3$  представляет собой группу, включающую олигоэтиленгликолевый фрагмент; и

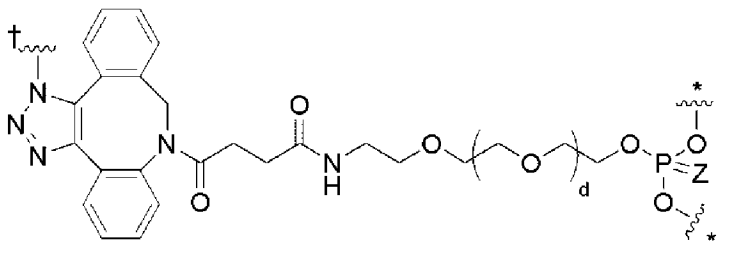
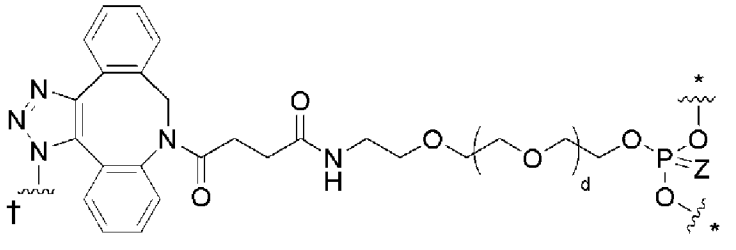
$R^1$  представляет собой C<sub>1-4</sub>-алкилен-гидрокси.

[0027] В некоторых вариантах осуществления  $b$  имеет значение 3. В некоторых вариантах осуществления (i) P включает по меньшей мере один модифицированный нуклеозид  $X^N$ ; (ii) P имеет по меньшей мере один модифицированный межнуклеозидный линкер  $Y^N$ , где по меньшей мере один из  $T^1$  или  $T^2$  представляет собой S; или (iii) как (i), так и (ii). В некоторых вариантах осуществления P has по меньшей мере один фосфородитионатный или фосфоротионатный межнуклеозидный линкер. В некоторых вариантах осуществления P включает 0, 1, 2 или 3 фосфородитионатных межнуклеозидных линкера. В некоторых вариантах осуществления P включает модифицированный нуклеозид, выбранный из группы, состоящей из 2'-O-алкилнуклеозида, 2'-O-алкоксиалкилнуклеозида, 2'-дезоксинуклеозида и рибонуклеозида. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеозид выбран из группы, состоящей из 5-бром-2'-O-метилуридина, 5-бром-2'-дезоксигуанидина, 2'-O-метилуридина, 2'-дезоксигуанидина, 2'-O-метилтимидина, 2'-O-метилцитидина, 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидина и 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 5-бром-2'-O-метилуридин, 5-бром-2'-дезоксигуанидин, 2'-O-метилуридин или 2'-дезоксигуанидин. В некоторых вариантах осуществления  $Y^{3'}$  или  $Y^N$  в 3'-положении  $X^{5'}$  включает незамещенный или замещенный фосфоротионат. В некоторых вариантах осуществления  $Y^{PTE}$  представляет собой:



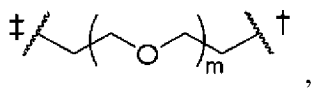
где Z представляет собой O или S; d представляет собой целое число от 0 до 95; два  $\sim^*$  на правой стороне структуры указывают точки присоединения к смежным нуклеозидам  $X^N$  в олигонуклеотиде P, и  $\sim^\dagger$  на левой стороне структуры указывает точку присоединения к линкеру L.

[0028] В некоторых вариантах осуществления  $Y^{PTE}$  представляет собой:



где Z представляет собой O или S; d представляет собой целое число от 0 до 95; два  $\sim^*$  на правой стороне структуры указывают точки присоединения к смежным нуклеозидам  $X^N$  в олигонуклеотиде P, и один  $\sim^\dagger$  на левой стороне структуры указывает точку присоединения к линкеру L.

[0029] В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой S. В некоторых вариантах осуществления d представляет собой целое число от 1 до 25. В некоторых вариантах осуществления линкер L включает полиэтиленгликолевый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления линкер L представляет собой



где m представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где  $\sim^\dagger$  указывает точку присоединения к  $Y^{PTE}$ , и  $\sim^\ddagger$  указывает точку присоединения к остальной части конъюгата.

[0030] В некоторых вариантах осуществления конъюгата P включает один или несколько сайтов CpG. В некоторых вариантах осуществления P включает по меньшей мере 3 сайта CpG. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгата включает две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два Q-tag пептида; где каждый из Q-tag пептидов связан с С-концом одной из тяжелых цепей антитела; и где один из Q-tag пептидов связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом (P) через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L).

[0031] В некоторых вариантах осуществления конъюгата:

(a) антитело включает легкую цепь, включающую последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:236-247 и 1000-1022, и/или тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:224-235 и 1030-1065;

(b) антитело включает легкую цепь, включающую последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:236-247 и 1000-1022, и/или тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1070-1117;

(c) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:236, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:224;

(d) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:237, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:225;

(e) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:238, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:226;

(f) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:239, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:227;

(g) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:240, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:228;

(h) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:241, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:229;

(i) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:242, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:230;

(j) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:243, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:231;

(k) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:244, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:232;

(l) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:245, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:233;

(m) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:246, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:234;

(n) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:247, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:235;

(o) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1000, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1030;

(p) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1001, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1031;

(q) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1002, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1032;

(r) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1003, и/или тяжелую









тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1117.

[0032] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается антитело, которое специфически связывается с нектин-4 человека, при этом антитело включает домен, представляющий собой переменную область легкой цепи (VL), и домен, представляющий собой переменную область тяжелой цепи (VH), где:

(a) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942 и 944, и VH-домен включает последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943 и 945;

(b) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:248, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:249;

(c) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:250, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:251;

(d) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:252, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:253;

(e) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:254, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:255;

(f) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:256, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:257;

(g) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:258, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:259;

(h) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:260, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:261;

(i) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:262, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:263;

(j) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:264, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:265;

(k) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-





SEQ ID NO:921;

(y) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:922, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:923;

(z) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:924, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:925;

(aa) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:926, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:927;

(bb) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:928, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:929;

(cc) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:930, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:931;

(dd) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:932, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:933;

(ee) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:934, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:935;

(ff) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:936, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:937;

(gg) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:938, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:939;

(hh) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:940, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:941;

(ii) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:942, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:943; или

(jj) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:944, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:945.

[0033] В некоторых вариантах осуществления антитела:

(a) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:275, CDR-H2 включает SEQ ID





NO:444, CDR-H3 включает SEQ ID NO:445, CDR-L1 включает SEQ ID NO:440, CDR-L2 включает SEQ ID NO:441 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:442;

(v) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:461, CDR-H2 включает SEQ ID NO:462, CDR-H3 включает SEQ ID NO:463, CDR-L1 включает SEQ ID NO:458, CDR-L2 включает SEQ ID NO:459 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:460;

(w) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:287, CDR-H2 включает SEQ ID NO:288, CDR-H3 включает SEQ ID NO:289, CDR-L1 включает SEQ ID NO:284, CDR-L2 включает SEQ ID NO:285 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:286;

(x) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:305, CDR-H2 включает SEQ ID NO:306, CDR-H3 включает SEQ ID NO:307, CDR-L1 включает SEQ ID NO:302, CDR-L2 включает SEQ ID NO:303 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:304;

(y) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:323, CDR-H2 включает SEQ ID NO:324, CDR-H3 включает SEQ ID NO:325, CDR-L1 включает SEQ ID NO:320, CDR-L2 включает SEQ ID NO:321 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:322;

(z) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:341, CDR-H2 включает SEQ ID NO:342, CDR-H3 включает SEQ ID NO:343, CDR-L1 включает SEQ ID NO:338, CDR-L2 включает SEQ ID NO:339 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:340;

(aa) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:359, CDR-H2 включает SEQ ID NO:360, CDR-H3 включает SEQ ID NO:361, CDR-L1 включает SEQ ID NO:356, CDR-L2 включает SEQ ID NO:357 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:358;

(bb) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:377, CDR-H2 включает SEQ ID NO:378, CDR-H3 включает SEQ ID NO:379, CDR-L1 включает SEQ ID NO:374, CDR-L2 включает SEQ ID NO:375 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:376;

(cc) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:395, CDR-H2 включает SEQ ID NO:396, CDR-H3 включает SEQ ID NO:397, CDR-L1 включает SEQ ID NO:392, CDR-L2 включает SEQ ID NO:393 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:394;

(dd) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:413, CDR-H2 включает SEQ ID NO:414, CDR-H3 включает SEQ ID NO:415, CDR-L1 включает SEQ ID NO:410, CDR-L2 включает SEQ ID NO:411 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:412;

(ee) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:431, CDR-H2 включает SEQ ID

NO:432, CDR-H3 включает SEQ ID NO:433, CDR-L1 включает SEQ ID NO:428, CDR-L2 включает SEQ ID NO:429 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:430;

(ff) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:449, CDR-H2 включает SEQ ID NO:450, CDR-H3 включает SEQ ID NO:451, CDR-L1 включает SEQ ID NO:446, CDR-L2 включает SEQ ID NO:447 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:448;

(gg) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:467, CDR-H2 включает SEQ ID NO:468, CDR-H3 включает SEQ ID NO:469, CDR-L1 включает SEQ ID NO:464, CDR-L2 включает SEQ ID NO:465 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:466;

(hh) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:479, CDR-H2 включает SEQ ID NO:480, CDR-H3 включает SEQ ID NO:481, CDR-L1 включает SEQ ID NO:476, CDR-L2 включает SEQ ID NO:477 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:478;

(ii) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:485, CDR-H2 включает SEQ ID NO:486, CDR-H3 включает SEQ ID NO:487, CDR-L1 включает SEQ ID NO:482, CDR-L2 включает SEQ ID NO:483 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:484;

(jj) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:473, CDR-H2 включает SEQ ID NO:474, CDR-H3 включает SEQ ID NO:475, CDR-L1 включает SEQ ID NO:470, CDR-L2 включает SEQ ID NO:471 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:472;

(kk) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:562, CDR-L2 включает SEQ ID NO:563 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:564, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:565, CDR-H2 включает SEQ ID NO:566 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:567;

(ll) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:580, CDR-L2 включает SEQ ID NO:581 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:582, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:583, CDR-H2 включает SEQ ID NO:584 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:585;

(mm) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:598, CDR-L2 включает SEQ ID NO:599 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:600, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:601, CDR-H2 включает SEQ ID NO:602 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:603;

(nn) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:616, CDR-L2 включает SEQ ID NO:617 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:618, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:619, CDR-H2 включает SEQ ID NO:620 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:621;

(oo) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:634, CDR-L2 включает SEQ ID



NO:815 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:816, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:817, CDR-H2 включает SEQ ID NO:818 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:819; или

(zz) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:832, CDR-L2 включает SEQ ID NO:833 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:834, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:835, CDR-H2 включает SEQ ID NO:836 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:837.

[0034] В некоторых вариантах осуществления антитела:

(a) VH-домен включает последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943 и 945, и/или VL-домен включает последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942 и 944;

(b) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:248 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:249;

(c) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:250 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:251;

(d) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:252 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:253;

(e) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:254 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:255;

(f) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:256 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:257;

(g) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:258 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:259;

(h) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:260 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:261;

(i) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:262 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:263;

(j) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:264 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:265;

(k) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:266 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:267;

(l) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:268 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:269;

(m) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:270 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:271;

(n) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:900 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:901;





(ii) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:942 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:943; или

(jj) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:944 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:945.

[0035] В некоторых вариантах осуществления антитело связано с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), включающими по меньшей мере один глутаминовый остаток. В некоторых вариантах осуществления антитело включает две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, и при этом один Q-tag присоединен к одной или обоим тяжелым цепям антитела. В некоторых вариантах осуществления Q-tag слит с C-концом тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления каждый Q-tag независимо включает пептидную последовательность, включающую от 5 до 15 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления Q-tag имеет природное происхождение. В некоторых вариантах осуществления пептидная последовательность каждого Q-tag независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:39-55. В некоторых вариантах осуществления Q-tag включает пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47). В некоторых вариантах осуществления каждый Q-tag независимо включает RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQGFPP (SEQ ID NO:48) или RPQGFPP (SEQ ID NO:49). В некоторых вариантах осуществления 1 или 2 Q-tag связан/связаны с антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:92-107, 111, 112, 178 и 494-497.

[0036] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab'-SH, Fv, scFv, однодоменное, содержащее только одну тяжелую цепь или содержащее только одну легкую цепь антитела, или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, выбранную из группы, состоящей из Fc-области IgG1, Fc-области IgG2 и Fc-области IgG4. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые уменьшают связывание с C1q. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые повышают связывание с C1q. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, демонстрирующую активность дикого типа, связанную с активацией комплемента. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые повышают активацию комплемента. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен и демонстрирующую связывающую активность дикого типа в отношении C1q. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую

одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают эффекторную функцию, по сравнению с человеческой Fc-областью, которая не содержит аминокислотную замену(замены). В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой: (a) Fc-область IgG1 человека, включающую замены L234A, L235A и/или G237A, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом; (b) Fc-область IgG2 человека, включающую замены A330S и/или P331S, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом; или (c) Fc-область IgG4 человека, включающую замены S228P и/или L235E, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом. В некоторых вариантах осуществления Fc-область дополнительно включает замену N297A, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1, которая сконструирована так, чтобы улучшить антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC активности). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна или две из тяжелых цепей антитела являются нефукозилированными. В некоторых вариантах осуществления антитело получают в клеточной линии с нокаутом альфа1,6-фукозилтрансферазы (Fut8). В некоторых вариантах осуществления антитело получают в клеточной линии, сверхэкспрессирующей  $\beta$ 1,4-N-ацетилгликозилтрансферазу III (GnT-III). В некоторых вариантах осуществления клеточная линия дополнительно сверхэкспрессирует  $\mu$ -маннозидазу Гольджи II (ManII). В некоторых вариантах осуществления антитело включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает ADCC активность. В некоторых вариантах осуществления антитело включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает ADCP активность. В некоторых вариантах осуществления антитело включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает CDC активность. В некоторых вариантах осуществления Fc-область включает замену G236A, где нумерация указана в соответствии с EU-индексом. В некоторых вариантах осуществления Fc-область включает замену G236A, где нумерация указана в соответствии с EU-индексом, и Fc-область является нефукозилированной.

[0037] В некоторых вариантах осуществления антитела:

(a) антитело включает легкую цепь, включающую последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:236-247 и 1000-1022, и/или тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:224-235 и 1030-1065;

(b) антитело включает легкую цепь, включающую последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:236-247 и 1000-1022, и/или тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей









тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1101;

(eeee) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1020, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1102;

(ffff) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1021, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1103;

(gggg) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1022, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1104;

(hhhh) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:236, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1105;

(iiii) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:242, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1106;

(jjjj) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:243, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1107;

(kkkk) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:245, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1108;

(llll) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1007, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1109;

(mmmm) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1008, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1110;

(nnnn) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1012, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1111;

(oooo) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1017, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1112;

(pppp) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1018, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1113;

(qqqq) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1019, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1114;

(rrrr) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1020, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1115;

(ssss) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1021, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1116; или

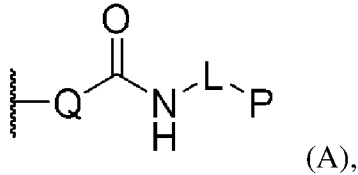
(tttt) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1022, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1117.

[0038] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой биспецифическое или мультиспецифическое антитело, которое включает по меньшей мере второй VL-домен и второй VH-домен, при этом второй VL-домен и второй VH-домен специфически связываются с другой мишенью, отличной от нектин-4 человека.

[0039] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ получения конъюгата, который включает (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab), которые специфически связываются с нектином-4 человека, и (ii) один или несколько



иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), включающими аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A),



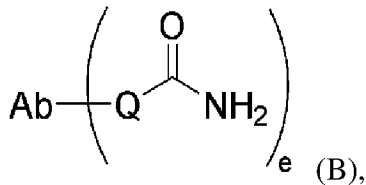
где:

~ указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, связанную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

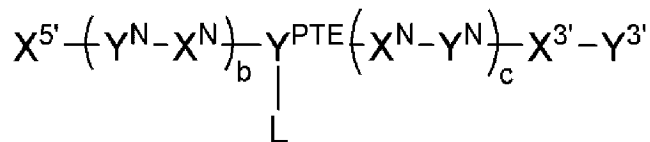
каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, включающий контактирование соединения формулы (B)



где Ab и Q имеют значение, определенное для формулы (A) выше, и e представляет собой целое число от 1 до 20,

с одним или несколькими иммуномодулирующими олигонуклеотидами P, где каждый P независимо:

(i) имеет следующую формулу:



где

X<sup>5'</sup> представляет собой 5'-концевой нуклеозид;

X<sup>3'</sup> представляет собой 3'-концевой нуклеозид;

Y<sup>PTE</sup> представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир;

Y<sup>3'</sup> представляет собой концевой фосфотриэфир;

каждый X<sup>N</sup> независимо представляет собой нуклеозид;

каждый Y<sup>N</sup> независимо представляет собой межнуклеозидный линкер;

b и c каждый независимо представляет собой целое число от 1 до 25; при условии,

что сумма b и c равна по меньшей мере 5; и

L представляет собой линкерную группу, включающую концевой амин; или

(ii) представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C) или (D);

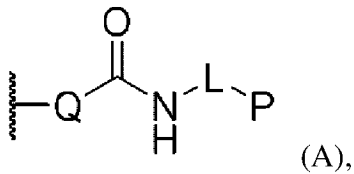
в присутствии трансглутаминазы. В некоторых вариантах осуществления каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид независимо представляет собой олигонуклеотид формулы (C) или формулы (D), выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов Таблицы 4 и Таблицы 6. В некоторых вариантах осуществления антитело соответствует любому из антител, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает отделение конъюгата, имеющего значение DAR, равное 1, от свободного олигонуклеотида, неконъюгированного антитела и конъюгатов, имеющих значение DAR, равное 2.

[0040] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается конъюгат, включающий любое из антител, описанных выше, конъюгированное с агентом. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой метку. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой цитотоксическое средство. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой средство, которое модулирует иммунную систему. В некоторых вариантах осуществления агент выбран из группы, состоящей из ингибитора IDO/TDO, ингибитора AhR, ингибитора аргиназы, ингибитора A2aR, агониста TLR, агониста STING и агониста Rig-1. В некоторых вариантах осуществления агент включает цитокин. В некоторых вариантах осуществления цитокин выбран из группы, состоящей из IL2, IL7, IL10, IL15 или IFN. В некоторых вариантах осуществления агент модулирует активность цитокина. В некоторых вариантах осуществления агент модулирует активность IL2, IL7, IL10, IL15 или интерферона. В некоторых вариантах осуществления агент включает противораковую вакцину.

[0041] В некоторых вариантах осуществления антител, описанных выше, или конъюгатов, описанных выше, антитело или антитело конъюгата связано со структурой модифицированного олигонуклеотида в соответствии с любой из структур модифицированных олигонуклеотидов, представленных в Таблицах 3-6.

[0042] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается фармацевтическая композиция, включающая любое из антител, описанных выше, или любой из конъюгатов, описанных выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0043] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)

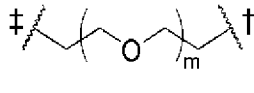


где:

~~~~~ указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

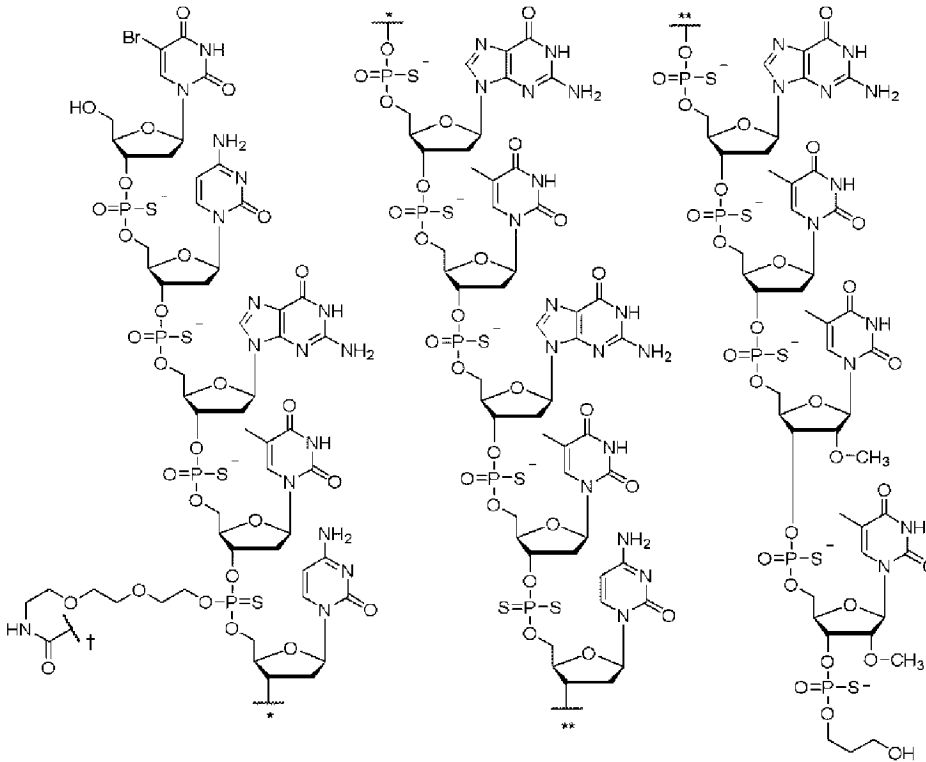
каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF<sub>3</sub>GPP (SEQ ID NO:49);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



где m представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где ~~~~† указывает точку присоединения к P, и ~~~~‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру

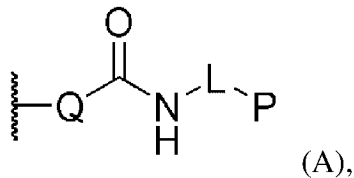


где ~~~~\* и ~~~~\*\* указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где ~~~~† указывает точку присоединения к линкеру L;

при этом антитело включает домен, представляющий собой переменную область тяжелой цепи (VH), и домен, представляющий собой переменную область легкой цепи

(VL), где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, а VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID NO:275, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID NO:276, CDR-H3 включает последовательность SEQ ID NO:277, CDR-L1 включает последовательность SEQ ID NO:272, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID NO:273 и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID NO:274.

[0044] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)

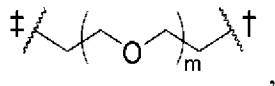


где:

~~~~~ указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

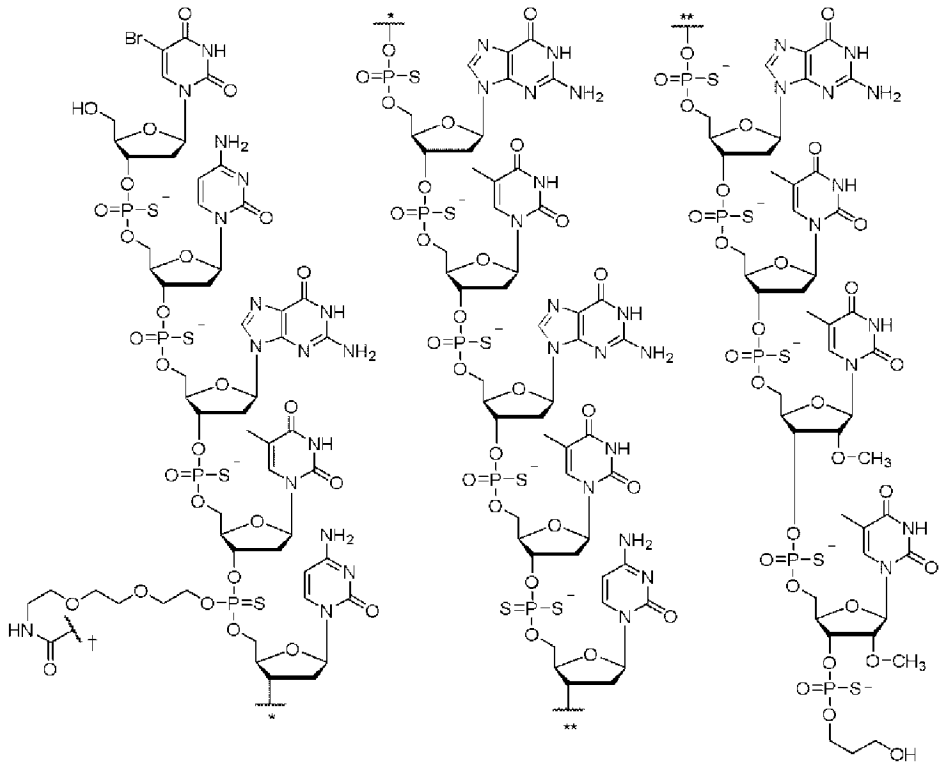
каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF<sub>2</sub>GPP (SEQ ID NO:49);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



где m представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где ~~~~ † указывает точку присоединения к P, и ~~~~ † указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

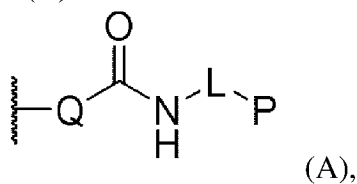
каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



где  $\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где  $\sim^+$  указывает точку присоединения к линкеру L;

при этом антитело включает домен, представляющий собой переменную область тяжелой цепи (VH), и домен, представляющий собой переменную область легкой цепи (VL), где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, а VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID NO:401, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID NO:402, CDR-H3 включает последовательность SEQ ID NO:403, CDR-L1 включает последовательность SEQ ID NO:398, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID NO:399 и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID NO:400.

[0045] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)



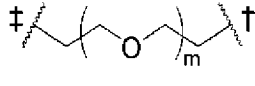
где:

$\sim$  указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его

антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

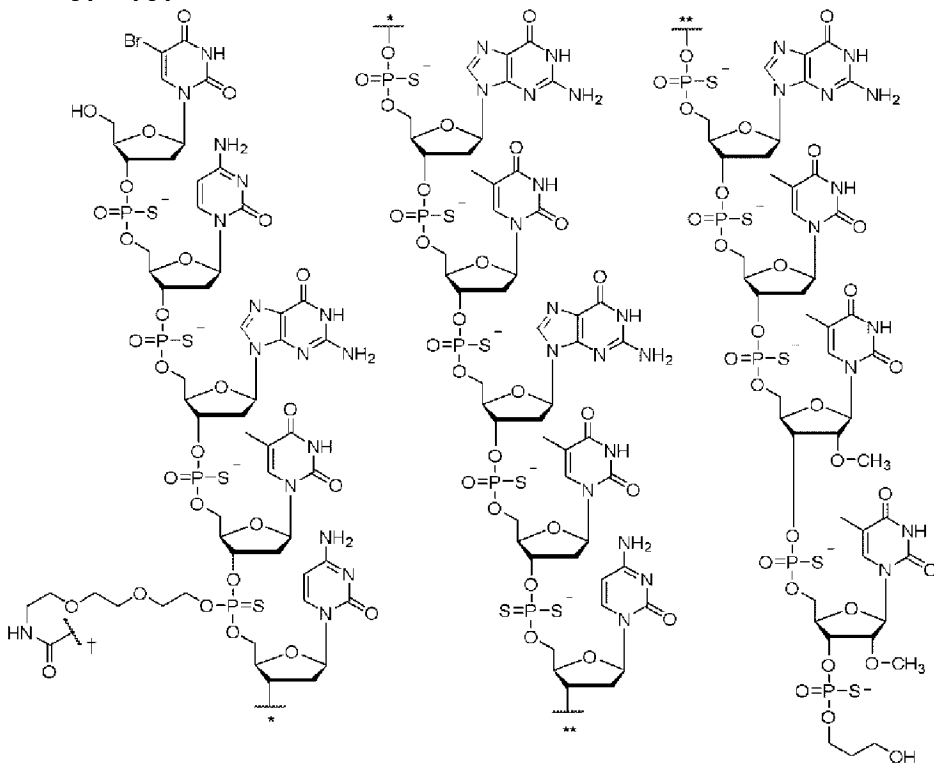
каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGFGRP (SEQ ID NO:49);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



где  $m$  представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где  $\sim \ddagger$  указывает точку присоединения к Р, и  $\sim \ddagger$  указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком, и

каждый Р независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру

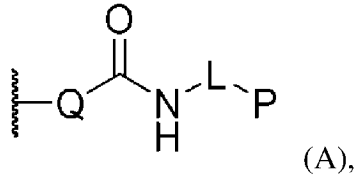


где  $\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где  $\sim \ddagger$  указывает точку присоединения к линкеру L;

при этом антитело включает домен, представляющий собой вариабельную область тяжелой цепи (VH), и домен, представляющий собой вариабельную область легкой цепи (VL), где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, а VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID NO:679, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID NO:680, CDR-H3 включает последовательность SEQ ID NO:681, CDR-L1 включает последовательность SEQ ID NO:676, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID NO:677 и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID NO:678.

[0046] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается конъюгат,

включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)

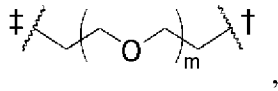


где:

указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

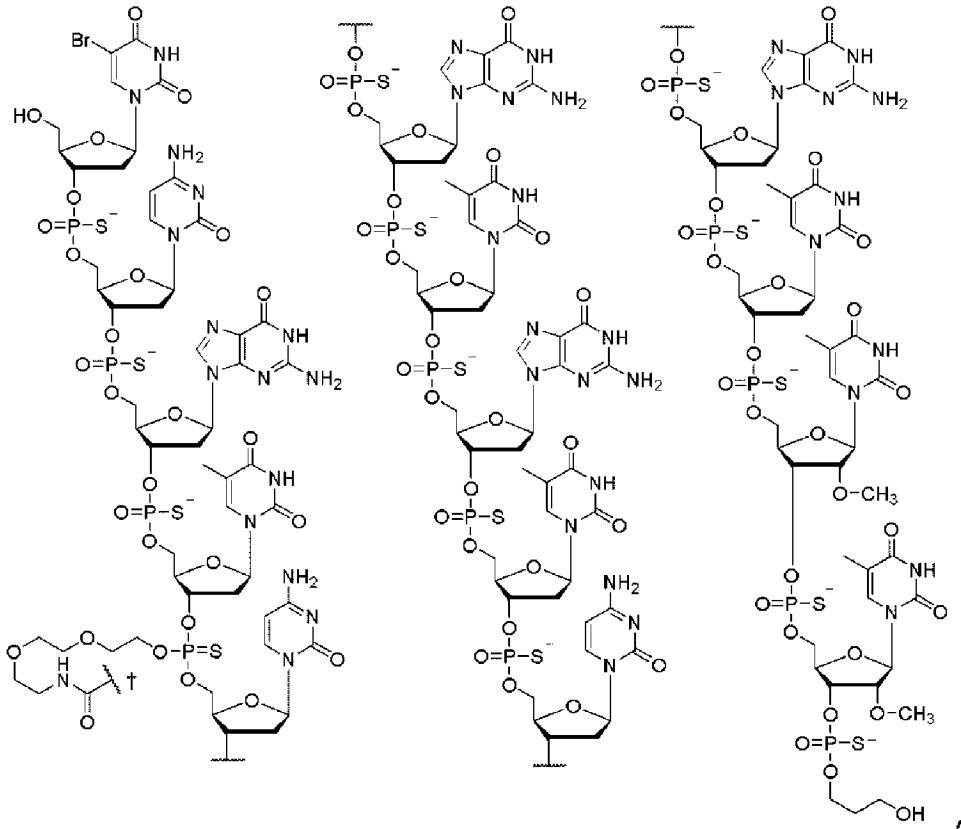
каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF<sub>2</sub>GPP (SEQ ID NO:49);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



где m представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где † указывает точку присоединения к P, и † указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

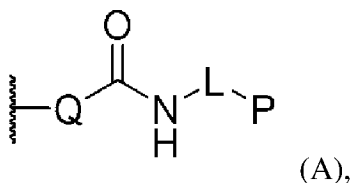
каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



где  $\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где  $\sim^\dagger$  указывает точку присоединения к линкеру L;

при этом антитело включает домен, представляющий собой вариабельную область тяжелой цепи (VH), и домен, представляющий собой вариабельную область легкой цепи (VL), где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, а VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID NO:275, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID NO:276, CDR-H3 включает последовательность SEQ ID NO:277, CDR-L1 включает последовательность SEQ ID NO:272, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID NO:273 и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID NO:274.

[0047] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)

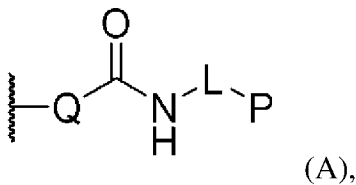






SEQ ID NO:403, CDR-L1 включает последовательность SEQ ID NO:398, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID NO:399 и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID NO:400.

[0048] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)

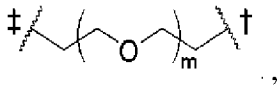


где:

указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

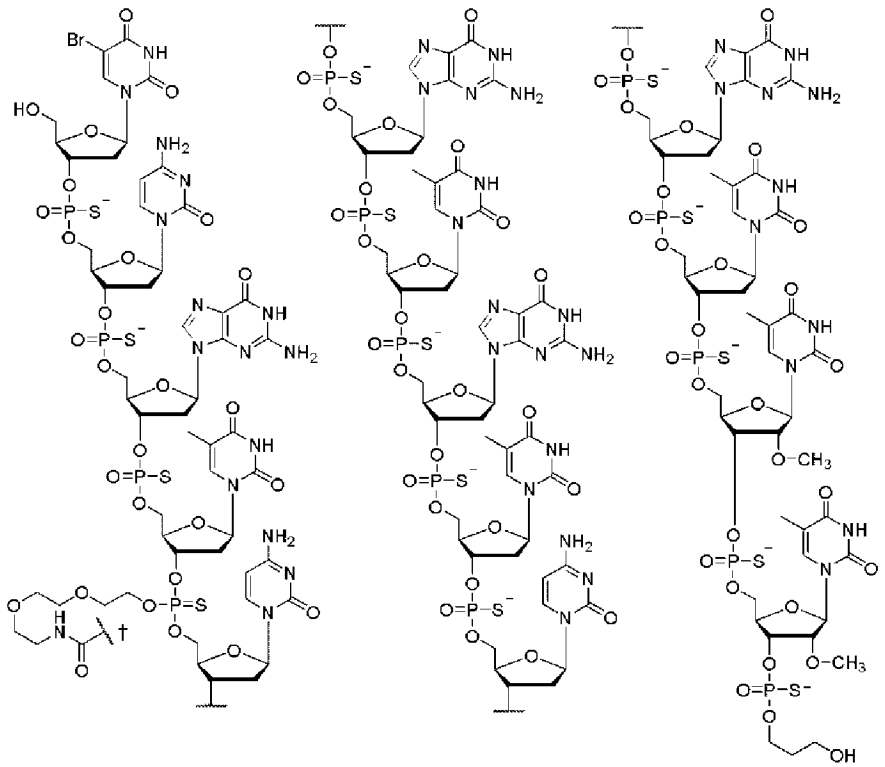
каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF<sub>2</sub>GPP (SEQ ID NO:49);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



где m представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где указывает точку присоединения к P, и указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



где  $\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где  $\sim^\dagger$  указывает точку присоединения к линкеру L;

при этом антитело включает домен, представляющий собой вариабельную область тяжелой цепи (VH), и домен, представляющий собой вариабельную область легкой цепи (VL), где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, а VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID NO:679, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID NO:680, CDR-H3 включает последовательность SEQ ID NO:681, CDR-L1 включает последовательность SEQ ID NO:676, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID NO:677 и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID NO:678.

[0049] В некоторых вариантах осуществления конъюгата, антитело конъюгата включает (а) домен, представляющий собой вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую SEQ ID NO: 935, и домен, представляющий собой вариабельную область легкой цепи (VL), включающую SEQ ID NO: 934; (б) тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 1047, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 1017; (с) тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 1060, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 1017; (д) тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1099, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1017; или (е) тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1112, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1017. В некоторых вариантах осуществления конъюгата, антитело конъюгата включает (а) домен, представляющий собой вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую SEQ ID NO: 937, и домен, представляющий собой вариабельную область легкой цепи (VL),

включающую SEQ ID NO: 936; (b) тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 1048, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1018; (c) тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 1061, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1018; (d) тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1100, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1018; или (e) тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1113, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1018. В некоторых вариантах осуществления конъюгата, антитело конъюгата включает (a) домен, представляющий собой переменную область тяжелой цепи (VH), включающую SEQ ID NO: 939, и домен, представляющий собой переменную область легкой цепи (VL), включающую SEQ ID NO: 938; (b) тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 1049, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 1019; (c) тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 1062, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 1019; (d) тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1101, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1019; или (e) тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1114, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1019.

[0050] В некоторых вариантах осуществления конъюгата  $m$  имеет значение от около 20 до около 30. В некоторых вариантах осуществления конъюгата  $m$  имеет значение около 24 или  $m$  имеет значение 24. В некоторых вариантах осуществления конъюгата  $L$  включает полиэтиленгликолевый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления конъюгата полиэтиленгликолевый фрагмент содержит около 24 этиленгликолевых звеньев или содержит 24 этиленгликолевых звеньев. В некоторых вариантах осуществления конъюгата каждый (P) и (L) в конъюгате независимо включают модифицированный олигонуклеотид SEQ ID NO:35. В некоторых вариантах осуществления конъюгата каждый (P) и (L) в конъюгате независимо включают модифицированный олигонуклеотид SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления конъюгата, антитело конъюгата включает Fc-область. В некоторых вариантах осуществления конъюгата Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления конъюгата Fc-область является нефукозилированной. В некоторых вариантах осуществления конъюгата Fc-область включает замену G236A, где нумерация указана в соответствии с EU-индексом. В некоторых вариантах осуществления конъюгата Fc-область включает замену G236A, где нумерация указана в соответствии с EU-индексом, и Fc-область является нефукозилированной. В некоторых вариантах осуществления конъюгата, конъюгат имеет значение DAR, равное 1 или 2.

[0051] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается фармацевтическая композиция, включающая любой из конъюгатов, описанных выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0052] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ лечения

рака, включающий введение субъекту эффективного количества любого из конъюгатов, описанных выше, любого из антител, описанных выше, или любой из фармацевтических композиций, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления раковые опухолевые клетки сверхэкспрессируют нектин-4 по сравнению с нормальными клетками, из которых происходит рак. В некоторых вариантах осуществления раковые опухолевые клетки экспрессируют нормальные или умеренные уровни нектин-4 по сравнению с нормальными клетками, из которых происходит рак. В некоторых вариантах осуществления раковые опухолевые клетки экспрессируют низкие уровни нектин-4 по сравнению с нормальными клетками, из которых происходит рак. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного противоракового терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно дополнительное противораковое терапевтическое средство включает химиотерапевтическое средство, иммунотерапевтическое средство, низкомолекулярный ингибитор (SMQ), терапевтическое антитело или противораковую вакцину. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой опухоль жидких тканей. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак пищевода, рак желудка, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, аденокарциному поджелудочной железы, карциному толстой кишки, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак матки, рак почки или рак желчного пузыря. В некоторых вариантах осуществления введение конъюгата или фармацевтической композиции активирует Т-клетки, дендритные клетки, моноциты и/или NK-клетки.

[0053] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ активации иммунных клеток у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества любого из конъюгатов, описанных выше, или любой из фармацевтических композиций, описанных выше, включающей конъюгат, где введение конъюгата или фармацевтической композиции активирует Т-клетки, дендритные клетки, моноциты и/или NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления субъект болен раком. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного противоракового терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно дополнительное противораковое терапевтическое средство включает химиотерапевтическое средство, иммунотерапевтическое средство, низкомолекулярный ингибитор (SMQ), терапевтическое антитело или противораковую вакцину. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой опухоль жидких тканей. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак пищевода, рак желудка, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, аденокарциному поджелудочной железы, карциному толстой кишки, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак матки, рак почки или рак желчного пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак является

рефрактерным к терапии ингибитором иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления терапия ингибитором иммунной контрольной точки включает ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1.

[0054] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ лечения опухоли или опухолевых клеток, включающий введение эффективного количества любого из конъюгатов, описанных выше, любого из антител, описанных выше, или любой из фармацевтических композиций, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления лечение опухоли или опухолевых клеток включает уничтожение опухоли или опухолевых клеток, индукцию цитотоксичности опухоли или опухолевых клеток, уменьшение или ингибирование жизнеспособности опухоли или опухолевых клеток, ингибирование роста опухоли или опухолевых клеток, ингибирование образования опухоли или опухолевых клеток, ингибирование или уменьшение метастазирования опухоли или опухолевых клеток, уменьшение размера опухоли или активацию иммунного ответа против опухоли или опухолевых клеток.

[0055] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается нуклеиновая кислота, кодирующая антитело любого из конъюгатов, описанных выше, или любое из антител, описанных выше.

[0056] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается вектор, включающий нуклеиновую кислоту, описанную выше. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии.

[0057] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается клетка-хозяин, включающая любой из векторов, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, клетку дрожжей, или бактериальную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку СНО.

[0058] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ получения любого из антител, описанных выше, при этом способ, включает культивирование любой из клеток-хозяев, описанных выше, в условиях для экспрессии антитела в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение и/или очистку антитела из клетки-хозяина.

#### **Краткое описание чертежей**

[0059] Настоящая заявка будет понятна со ссылкой на следующее описание, рассматриваемое вместе с прилагаемыми чертежами.

[0060] Фиг. 1А-1В показывают активность иммуномодулирующих олигонуклеотидов отдельно в человеческих РВМС на основании наблюдаемой повышенной экспрессии (а) HLADR (Фиг. 1А) и (b) CD40 (Фиг. 1В).

[0061] Фиг. 2А-2С показывают эффект иммуномодулирующих олигонуклеотидов и их конъюгатов с антителами на повышение количества и активацию В-клеток. Фиг. 2А показывает наблюдаемый эффект на количество В-клеток различными иммуномодулирующими полипептидами отдельно. Фиг. 2В-2С показывают наблюдаемую

активацию В-клеток (посредством детекции экспрессии CD40), вызванную иммуномодулирующими олигонуклеотидами, используемыми отдельно.

[0062] Фиг. 3 показывает выходы в процентах трансклутаминаза-опосредованных конъюгаций и деконъюгаций с полиэтиленгликолевым линкером (-NH-C(=O)-PEG<sub>23</sub>-NH<sub>2</sub>) и различными Q-tag. Показаны SEQ ID No:39-47 и 50-52.

[0063] Фиг. 4А и 4В показывают процентное изменение конъюгации и деконъюгации с течением времени при трансклутаминаза-опосредованной конъюгации двух Q-tag пептидов (LSLSPGLLQGG, SEQ ID NO:39; и RPQGF, SEQ ID NO:47).

[0064] Фиг. 5 показывает активность указанных свободных CpG олигонуклеотидов в человеческих PBMC, как определено в анализе экспрессии на CD19<sup>+</sup> В-клетках.

[0065] Фиг. 6 показывает активность указанных свободных CpG олигонуклеотидов в человеческих PBMC, как определено в анализе Ramos NFκB репортера.

[0066] Фиг. 7А-7С показывают активность указанных свободных CpG олигонуклеотидов в человеческих PBMC из трех разных донорных линий (D559 Фиг. 7А, D804 Фиг. 7В и D643 Фиг. 7С), наблюдаемую по экспрессии CD40.

[0067] Фиг. 8 показывает активность указанных свободных CpG олигонуклеотидов в человеческих PBMC, как определено в анализе экспрессии CD40 на CD19<sup>+</sup> В-клетках.

[0068] Фиг. 9А-9D схематически представляют иллюстративные конъюгаты в соответствии с некоторыми вариантами осуществления. Иллюстративные конъюгаты антитело:CpG с сконструированным Q-tag, слитым с С-концом тяжелой цепи, показаны на Фиг. 9А (с DAR=1) и на Фиг. 9В (с DAR=2). Иллюстративные конъюгаты антитело:CpG с природным Q-tag (Q295), доступным для конъюгации в результате N297A мутации, показаны на Фиг. 9С (с DAR=1) и на Фиг. 9D (с DAR=2).

[0069] Фиг. 10 показывает результаты конкурентного эксперимента между различными антителами к нектину-4.

[0070] Фиг. 11 показывает активацию моноцитов конъюгатами антитело к нектину-4-CpG в нектин-4-экспрессирующих клетках (слева) и нектин-4-отрицательных клетках (справа).

[0071] Фиг. 12 показывает активацию дендритных клеток конъюгатами антитело к нектину-4-CpG в нектин-4-экспрессирующих клетках (слева) и нектин-4-отрицательных клетках (справа).

[0072] Фиг. 13 показывает усиление фагоцитоза опухоли различными конъюгатами антител к нектину-4.

[0073] Фиг. 14А-14D показывает повышение секреции цитокинов из PBMC при использовании различных конъюгатов антитело к нектину-4-CpG, показанное на графике как кратное повышение активности по сравнению с использованием соответствующего неконъюгированного антитела к нектину-4. Фиг. 14А показывает индукцию IFNα<sub>2</sub>, Фиг. 14В показывает индукцию IFNγ, Фиг. 14С показывает индукцию IL6, и Фиг. 14D показывает индукцию IL10.

[0074] Фиг. 15 показывает интернализацию антител к нектину-4.

[0075] Фиг. 16А-16В показывает противоопухолевую активность конъюгата антитела к нектину-4 на МС38 нектин-4 опухолях. Фиг. 16А показывает широкую экспрессию нектин-4 на МС38 нектин-4 клетках, и Фиг. 16В показывает противоопухолевую активность конъюгата антитела к нектину-4.

[0076] Фиг. 17 показывает активацию Т-клеток конъюгатами антител к нектину-4, как определено по проценту CD69 на CD3<sup>+</sup> Т-клетках.

[0077] Фиг. 18 показывает активацию НК-клеток конъюгатами антител к нектину-4, как определено в анализе экспрессии CD69 на CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> НК-клетках.

[0078] Фиг. 19 показывает активацию НК-клеток конъюгатами антител к нектину-4, как определено в анализе экспрессии IRF7.

[0079] Фиг. 20А-20В показывают противоопухолевую активность конъюгатов антител к нектину-4 *in vivo*. Стрелки показывают дни введения.

[0080] Фиг. 21 показывает связывание различных антител к нектину-4 с клетками SKBR3, эндогенно экспрессирующими нектин-4.

[0081] Фиг. 22 показывает интернализацию указанных антител к нектину-4 в T47D (вверху) или нектин-4-DLD клетках (внизу).

[0082] Фиг. 23 показывает активацию иммунных клеток конъюгатами антител к нектину-4 в нектин-4-DLD клетках, показанную на графике как кратное изменение по сравнению с соответствующим неконъюгированным антителом к нектину-4.

[0083] Фиг. 24 показывает активацию иммунных клеток конъюгатами антител к нектину-4 в OE19 клетках, показанную на графике как кратное изменение по сравнению с соответствующим неконъюгированным антителом к нектину-4.

[0084] Фиг. 25 показывает активацию иммунных клеток конъюгатами антител к нектину-4 в нектин-4-DLD клетках, показанную на графике как кратное изменение по сравнению с соответствующим неконъюгированным антителом к нектину-4.

[0085] Фиг. 26 показывает активацию иммунных клеток конъюгатами антител к нектину-4 в HT1376 клетках, показанную на графике как кратное изменение по сравнению с соответствующим неконъюгированным антителом к нектину-4.

[0086] Фиг. 27 показывает активацию иммунных клеток конъюгатами антител к нектину-4 в H292 клетках, показанную на графике как кратное изменение по сравнению с соответствующим неконъюгированным антителом к нектину-4.

[0087] Фиг. 28 показывает активацию иммунных клеток в OE19 клетках конъюгатом антитела к нектину-4-СрG (TNT-266а, слева) или антителом к нектину-4, конъюгированным с агонистом TLR8 (конъюгат обозначен как TNT-347xx, справа), показанную на графике как кратное изменение по сравнению с соответствующим неконъюгированным антителом к нектину-4.

[0088] Фиг. 29 показывает противоопухолевую активность конъюгата антитела к нектину-4 и конъюгата антитела к нектину-4 с MMAE на опухолях МС38 нектин-4.

[0089] Фиг. 30 показывает активацию иммунных клеток конъюгатами антител к нектину-4 с человеческим IgG1 или нефукозилированным человеческим IgG1 в клетках



нектин-4 DLD.

[0090] Фиг. 31 показывает активацию В-клеток конъюгатами антител к нектину-4 в клетках нектин-4 DLD (вверху слева), HT1376 (вверху справа), OE19 (внизу слева) и H292 (внизу справа).

[0091] Фиг. 32 показывает активацию В-клеток конъюгатами антител к нектину-4 в клетках нектин-4 DLD (вверху слева), HT1376 (в середине справа) и H292 (внизу слева).

[0092] Фиг. 33 показывает вторичный иммунный ответ в опухолевых клетках MC38 после обработки указанными конъюгатами антител или PBS.

[0093] Фиг. 34 показывает противоопухолевую активность *in vivo* конъюгатов антител к нектину-4 против опухолей SKBR3.

[0094] Фиг. 35А-35В показывают противоопухолевую активность *in vivo* конъюгатов антител к нектину-4 против нектин-4-экспрессирующих опухолей СТ26 (Фиг. 35А) и опухолей ЕМТ6 (Фиг. 35В).

[0095] Фиг. 36А-36В показывает противоопухолевую активность *in vivo* конъюгатов антител к нектину-4 против нектин-4-экспрессирующих опухолей СТ26 (Фиг. 36А) и опухолей ЕМТ6 (Фиг. 36В).

[0096] Фиг. 37 представляет сравнение противоопухолевой активности *in vivo* конъюгатов антител к нектину-4 с DAR1 и DAR2.

[0097] Фиг. 38 показывает активность фукозилированных и нефукозилированных конъюгатов в клеточных линиях HT1376 и H292.

[0098] Фиг. 39 показывает активность конъюгатов фукозилированных и нефукозилированных антител к нектину-4 в отношении пролиферации дендритных клеток.

[0099] Фиг. 40 показывает цитотоксическую активность конъюгатов антител к нектину-4 в отношении опухолевых клеток.

### **Подробное описание изобретения**

[0100] Следующее описание представляет иллюстративные способы, параметры и т.п. Однако следует понимать, что такое описание не предназначено для ограничения объема настоящего изобретения, а представлено только в качестве описания иллюстративных вариантов осуществления.

[0101] Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии новых антител к нектину-4 (т.е. антител против нектин-4; антител, которые связывают нектин-4; антител, которые специфически связывают нектин-4). Настоящее изобретение также основано, частью, на конъюгации антител к нектину-4 с агентом, таким как иммуномодулирующий олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления антитела к нектину-4 конъюгированы с CpG олигонуклеотидами (т.е. также указаны в настоящей заявке как конъюгаты антител к нектину-4 с CpG, конъюгаты антител к нектину-4-олигонуклеотид, конъюгаты антител к нектину-4, конъюгаты антител против нектин-4 или, если в контексте не указано иное, «конъюгат»), которые обеспечивают направленную доставку CpG олигонуклеотидов для активации TLR9. Также описаны способы получения

этих конъюгатов. В частности, конъюгацию можно осуществлять путем трансглутаминаза(Tgase)-опосредованной реакции. Также представлены промежуточные соединения, которые можно использовать для получения этих конъюгатов.

[0102] Также в настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, включающие конъюгаты антител к нектину-4 и антитела к нектину-4, наборы и способы лечения (включая способы лечения рака) с использованием конъюгатов и антител.

### **I. Определения**

[0103] Если не указано иное, все используемые технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное раскрытие. Все патенты, заявки, опубликованные заявки и другие публикации, которые приведены в качестве ссылки в настоящей заявке, включены посредством ссылки во всей их полноте. Если определение, приведенное в этом разделе, противоречит или иным образом несовместимо с определением, приведенном в патенте, заявке или другой публикации, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки, определение, приведенное в этом разделе, имеет преимущественную силу над определением, включенным в настоящую заявку посредством ссылки.

[0104] Должно быть понятно, что некоторые признаки настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены отдельно или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящиеся к конкретным стадиям способа, реагентам или условиям, конкретно включены в настоящее описание и раскрыты в настоящей заявке так же, как если бы каждая комбинация была раскрыта индивидуально и явным образом.

[0105] Используемые здесь и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа «а», «an» и «the» включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Также отмечается, что формула изобретения может быть составлена таким образом, чтобы исключить любой необязательный элемент. По сути, это заявление предназначено служить основанием для использования таких исключаящих терминов, как «исключительно», «только» и т.п. в связи с изложением элементов формулы изобретения или использованием «отрицательного» ограничения.

[0106] В данной заявке, если в контексте не указано иное, ссылки на соединение формулы (A)-(D) включают его ионные формы, полиморфы, псевдополиморфы, аморфные формы, сольваты, сокристаллы, хелаты, изомеры, таутомеры, оксиды (например, N-оксиды, S-оксиды), сложные эфиры, пролекарства, изотопы и/или защищенные формы. В некоторых вариантах осуществления ссылки на соединение формулы (A)-(D) включают его полиморфы, сольваты, сокристаллы, изомеры, таутомеры и/или оксиды. В некоторых вариантах осуществления ссылки на соединение формулы (A)-(D) включают его полиморфы, сольваты и/или сокристаллы. В некоторых вариантах

осуществления ссылки на соединение формулы (A)-(D) включают его изомеры, таутомеры и/или оксиды. В некоторых вариантах осуществления ссылки на соединение формулы (A)-(D) включают его сольваты.

[0107] "*Алкил*" охватывает линейные и разветвленные углеродные цепи, имеющие указанное количество атомов углерода, например, от 1 до 20 атомов углерода, или от 1 до 8 атомов углерода, или от 1 до 6 атомов углерода. Например, C<sub>1-6</sub> алкил включает как линейный, так и разветвленный алкил, содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Когда назван алкильный остаток, имеющий определенное количество атомов углерода, подразумеваются все варианты с разветвленной и прямой цепью, имеющие такое количество атомов углерода; так, например, «пропил» включает н-пропил и изопропил; и «бутил» включает н-бутил, втор-бутил, изобутил и трет-бутил. Примеры алкильных групп включают, но не ограничиваются этим, метил, этил, пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, 2-пентил, 3-пентил, изопентил, неопентил, гексил, 2-гексил, 3-гексил и 3-метилпентил.

[0100] Когда приводится диапазон значений (например, C<sub>1-6</sub> алкил), включено каждое значение в этом диапазоне, а также все промежуточные диапазоны. Например, "C<sub>1-6</sub> алкил" включает C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>1-6</sub>, C<sub>2-6</sub>, C<sub>3-6</sub>, C<sub>4-6</sub>, C<sub>5-6</sub>, C<sub>1-5</sub>, C<sub>2-5</sub>, C<sub>3-5</sub>, C<sub>4-5</sub>, C<sub>1-4</sub>, C<sub>2-4</sub>, C<sub>3-4</sub>, C<sub>1-3</sub>, C<sub>2-3</sub> и C<sub>1-2</sub> алкил.

[0109] "*Алкенил*" относится к ненасыщенной разветвленной или линейной алкильной группе, имеющей указанное количество атомов углерода (например, 2-8 или 2-6 атомов углерода) и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Группа может быть либо в цис, либо в транс конфигурации (в Z или E конфигурации) вокруг двойной связи(связей). Алкенильные группы включают, но не ограничиваются этим, этенил, пропенил (например, проп-1-ен-1-ил, проп-1-ен-2-ил, проп-2-ен-1-ил (аллил), проп-2-ен-2-ил) и бутенил (например, бут-1-ен-1-ил, бут-1-ен-2-ил, 2-метил-проп-1-ен-1-ил, бут-2-ен-1-ил, бут-2-ен-1-ил, бут-2-ен-2-ил, бута-1,3-диен-1-ил, бута-1,3-диен-2-ил).

[0110] "*Алкинил*" относится к ненасыщенной разветвленной или линейной алкильной группе, имеющей указанное количество атомов углерода (например, 2-8 или 2-6 атомов углерода) и по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Алкинильные группы включают, но не ограничиваются этим, этинил, пропинил (например, проп-1-ин-1-ил, проп-2-ин-1-ил) и бутинил (например, бут-1-ин-1-ил, бут-1-ин-3-ил, бут-3-ин-1-ил).

[0111] Термин "*амино*", используемый в настоящей заявке, означает -N(R<sup>N1</sup>)<sub>2</sub>, где, если амино является незамещенным, оба R<sup>N1</sup> представляют собой H; или, если амино является замещенным, каждый R<sup>N1</sup> независимо представляет собой H, -OH, -NO<sub>2</sub>, -N(R<sup>N2</sup>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>OR<sup>N2</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>N2</sup>, -SOR<sup>N2</sup>, -COOR<sup>N2</sup>, N-защитную группу, алкил, алкенил, алкинил, алкокси, арил, арилалкил, арилокси, циклоалкил, циклоалкенил, гетероалкил или гетероциклил, при условии, что по меньшей мере один R<sup>N1</sup> не является H, и где каждый R<sup>N2</sup> независимо представляет собой H, алкил или арил. Каждый из заместителей сам может быть незамещенным или может быть замещен незамещенным

заместителем(заместителями), определенным в настоящей заявке для каждой соответствующей группы. В некоторых вариантах осуществления амина представляет собой незамещенный амина (*m.e.*  $-\text{NH}_2$ ) или замещенный амина (*например*,  $-\text{NHR}^{\text{N1}}$ ), где  $\text{R}^{\text{N1}}$  независимо представляет собой  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SO}_2\text{OR}^{\text{N2}}$ ,  $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{N2}}$ ,  $-\text{SOR}^{\text{N2}}$ ,  $-\text{COOR}^{\text{N2}}$ , необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный арил, и каждый  $\text{R}^{\text{N2}}$  может представлять собой необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный арил. В некоторых вариантах осуществления замещенный амина может представлять собой алкиламина, в котором алкильные группы необязательно замещены, как описано в настоящей заявке для алкила. В некоторых вариантах осуществления аминогруппа представляет собой  $-\text{NHR}^{\text{N1}}$ , в которой  $\text{R}^{\text{N1}}$  представляет собой необязательно замещенный алкил. Неограничивающие примеры  $-\text{NHR}^{\text{N1}}$ , в котором  $\text{R}^{\text{N1}}$  представляет собой необязательно замещенный алкил, включают: необязательно замещенный алкиламина, протеиногенную аминокислоту, непротеиногенную аминокислоту,  $\text{C}_{1-6}$  алкиловый эфир протеиногенной аминокислоты и  $\text{C}_{1-6}$  алкиловый эфир непротеиногенной аминокислоты. Используемая аминокислота необязательно находится в L-форме.

[0112] Термин "*иммуномодулирующий олигонуклеотид*" используемый в настоящей заявке, означает олигонуклеотидную конструкцию, содержащую в общей сложности от 6 до 50 смежных нуклеозидов, ковалентно связанных вместе межнуклеозидными мостиковыми группами, независимо выбранными из группы, состоящей из межнуклеозидных фосфоэфиров и, необязательно, межнуклеозидных спейсеров без азотистых оснований. Иммуномодулирующие олигонуклеотиды кэппированы на 5'- и 3'-концах 5'- и 3'-кэппирующими группами, соответственно. Иммуномодулирующие олигонуклеотиды способны модулировать врожденный иммунный ответ, что определяется, например, изменением активации внутриклеточного сигнального пути(путей), включая, но не ограничиваясь этим, NF $\kappa$ B, изменением экспрессии маркера активации или изменением секреции по меньшей мере одного воспалительного цитокина или по меньшей мере одного интерферона I типа в иммунной клетке (например, антигенпрезентирующей клетке), в которую был доставлен иммуномодулирующий олигонуклеотид (например, по сравнению с другой иммунной клеткой (например, антигенпрезентирующей клеткой), в которую не был доставлен иммуномодулирующий олигонуклеотид), или в иммунной клетке, которая взаимодействует с иммунной клеткой (например, антигенпрезентирующей клеткой), в которую был доставлен иммуномодулирующий олигонуклеотид (включая прямые межклеточные взаимодействия, а также опосредованную стимуляцию (например, от одного или нескольких цитокинов, секретлируемых клеткой, в которую был доставлен иммуномодулирующий олигонуклеотид). Иммуномодулирующий олигонуклеотид может содержать конъюгирующую группу или, если иммуномодулирующий олигонуклеотид является частью конъюгата, линкер, связанный с нацеливающим фрагментом и необязательно с одним или несколькими (например, 1-6) вспомогательными фрагментами (например,

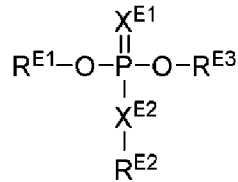
полиэтиленгликолями). Конъюгирующая группа или линкер могут быть частью фосфотриэфира или концевой кэппирующей группы.

[0113] Термин "*иммуностимулирующий олигонуклеотид*" используемый в настоящей заявке, означает иммуномодулирующий олигонуклеотид, способный активировать иммунный ответ, что определяется, например, увеличением активации внутриклеточного сигнального пути(путей), такого как NFκB, или увеличением уровней клеточного поверхностного маркера(маркеров) активации или функции или повышения секреции по меньшей мере одного воспалительного цитокина или по меньшей мере одного интерферона I типа в иммунной клетке (например, антигенпрезентирующей клетке), в которую был доставлен иммуностимулирующий олигонуклеотид (например, по сравнению с другой иммунной клеткой (например, антигенпрезентирующей клеткой), в которую не был доставлен иммуностимулирующий олигонуклеотид), или в иммунной клетке, которая взаимодействует с иммунной клеткой (например, антигенпрезентирующей клеткой), в которую был доставлен иммуномодулирующий олигонуклеотид (включая прямое межклеточное взаимодействие, а также опосредованную стимуляцию, например, от одного или нескольких цитокинов, секретлируемых клеткой, в которую был доставлен иммуномодулирующий олигонуклеотид). В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну цитидин-п-гуанозиновую (CpG) последовательность, в которой p представляет собой межнуклеозидный фосфодиэфир (например, фосфат или фосфоротиоат) или межнуклеозидный фосфотриэфир или фосфотиотриэфир. В данном контексте CpG-содержащий иммуностимулирующий олигонуклеотид может быть природным, например CpG ODN бактериального или вирусного происхождения, или синтетическим. Например, в некоторых вариантах осуществления последовательность CpG в иммуностимулирующем олигонуклеотиде содержит 2'-дезоксирибозу.

[0114] Термин "*иммуносупрессивный олигонуклеотид*" используемый в настоящей заявке, означает иммуномодулирующий олигонуклеотид, способный противодействовать иммунному ответу, что определяется, например, снижением активации или отсутствием активации NFκB, или отсутствием увеличения уровней клеточного поверхностного маркера(маркеров) активации функции или снижения или отсутствия повышения секреции по меньшей мере одного воспалительного цитокина или по меньшей мере одного интерферона I типа в иммунной клетке (например, антигенпрезентирующей клетке), в которую был доставлен иммуносупрессивный олигонуклеотид (например, по сравнению с другой иммунной клеткой (например, антигенпрезентирующей клеткой), в которую не был доставлен иммуносупрессивный олигонуклеотид), или в иммунной клетке, которая взаимодействует с иммунной клеткой (например, антигенпрезентирующей клеткой), в которую был доставлен иммуномодулирующий олигонуклеотид (включая прямое межклеточное взаимодействие, а также опосредованную стимуляцию, например, от одного или нескольких цитокинов, секретлируемых клеткой, в которую был доставлен иммуномодулирующий олигонуклеотид).

[0115] Должно быть понятно, что термины “олигонуклеотид” и “олигонуклеотид” могут использоваться взаимозаменяемо. Кроме того, следует понимать, что термины “иммуномодулирующий олигонуклеотид”, “иммуностимулирующий олигонуклеотид”, “иммуносупрессивный олигонуклеотид” и “конъюгат” охватывают соли иммуномодулирующего олигонуклеотида, иммуностимулирующего олигонуклеотида, иммуносупрессивного олигонуклеотида и конъюгата, соответственно. Например, термины “иммуномодулирующий олигонуклеотид”, “иммуностимулирующий олигонуклеотид”, “иммуносупрессивный олигонуклеотид” и “конъюгат” охватывают как протонированную нейтральную форму (группа P-XH, где X представляет собой O или S) фосфата, фосфоротиоата или фосфородитиоата, так и депротонированную ионную форму (группа P-X-, где X представляет собой O или S) фосфата, фосфоротиоата или фосфородитиоата. Соответственно, следует понимать, что фосфоэферы и фосфодиеферы, описанные как содержащие один или несколько из  $R^{E1}$ ,  $R^{E2}$  и  $R^{E3}$  в качестве водорода, охватывают соли, в которых фосфат, фосфоротиоат или фосфородитиоат присутствует в депротонированной ионной форме. Кроме того, термины «свободный», «голый» и «неконъюгированный», относящиеся к иммуномодулирующим олигонуклеотидам, иммуностимулирующим олигонуклеотидам, иммуносупрессивным олигонуклеотидам и/или олигонуклеотидам (например, CpG олигонуклеотидам), могут использоваться взаимозаменяемо в настоящей заявке.

[0116] Термин “*фосфотриэфир*,” используемый в настоящей заявке, относится к фосфоэфери, в котором все три валентности замещены неводородными заместителями. Фосфотриэфир состоит из фосфата, фосфоротиоата или фосфородитиоата; одной или двух связей с нуклеозидом(нуклеозидами), или спейсером(спейсерами) без азотистого основания, и/или фосфорильной группой(группами); и одной или двух групп, независимо выбранных из группы, состоящей из биообратимой группы; небиообратимой группы; вспомогательной группы; конъюгирующей группы; и линкера, связанного с нацеливающим фрагментом и необязательно с одной или несколькими (например, 1-6) вспомогательными группами. Концевой фосфотриэфир включает одну связь с группой, содержащей нуклеозид, и две группы, независимо выбранные из группы, состоящей из биообратимой группы; небиообратимой группы; вспомогательной группы; конъюгирующей группы; фосфорильной группы; и линкера, связанного с нацеливающим фрагментом и необязательно с одной или несколькими (например, 1-6) вспомогательными группами. В некоторых вариантах осуществления концевой фосфотриэфир содержит 1 или 0 линкеров, связанных с нацеливающим фрагментом и необязательно с одной или несколькими (например, 1-6) вспомогательными группами. Межнуклеозидный фосфотриэфир включает две связи с нуклеозид-содержащими группами. Фосфотриэфир может представлять собой группу следующей структуры:



где:

каждый из  $\text{X}^{\text{E1}}$  и  $\text{X}^{\text{E2}}$  независимо представляет собой O или S;

каждый из  $\text{R}^{\text{E1}}$  и  $\text{R}^{\text{E3}}$  независимо представляет собой связь с нуклеозидом; аналог сахара спейсера без азотистого основания; биообратимую группу; небиообратимую группу; вспомогательную группу; конъюгирующую группу; линкер, связанный с нацеливающим фрагментом; линкер, связанный с нацеливающим фрагментом и одной или несколькими (например, 1-6) вспомогательными группами; или атом фосфора в группе формулы  $-\text{P}(=\text{X}^{\text{E1}})(-\text{X}^{\text{E2}}-\text{R}^{\text{E2}}\text{A})-\text{O}-$ ,

где  $\text{R}^{\text{E2}}\text{A}$  представляет собой водород; биообратимую группу; небиообратимую группу; вспомогательную группу; конъюгирующую группу; линкер, связанный с нацеливающим фрагментом; или линкер, связанный с нацеливающим фрагментом и одной или несколькими (например, 1-6) вспомогательными группами; и

$\text{R}^{\text{E2}}$  представляет собой биообратимую группу; небиообратимую группу; вспомогательную группу; конъюгирующую группу; линкер, связанный с нацеливающим фрагментом; или линкер, связанный с нацеливающим фрагментом и одной или несколькими (например, 1-6) вспомогательными группами;

при условии, что по меньшей мере один из  $\text{R}^{\text{E1}}$  и  $\text{R}^{\text{E3}}$  представляет собой связь с группой, содержащей по меньшей мере один нуклеозид.

Если оба  $\text{R}^{\text{E1}}$  и  $\text{R}^{\text{E3}}$  представляют собой связи с группами, содержащими по меньшей мере один нуклеозид, фосфотриэфир представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир. Если один и только один из  $\text{R}^{\text{E1}}$  и  $\text{R}^{\text{E3}}$  представляет собой связь с группой, содержащей нуклеозид, фосфотриэфир представляет собой концевой фосфотриэфир.

[0117] Используемый в настоящей заявке, термин "*аминокислота*" относится к любой аминокислоте (как стандартным, так и нестандартным аминокислотам), включая, но не ограничиваясь этим,  $\alpha$ -аминокислоты,  $\beta$ -аминокислоты,  $\gamma$ -аминокислоты и  $\delta$ -аминокислоты. Примеры подходящих аминокислот включают, но не ограничиваются этим, аланин, аспарагин, аспартат, цистеин, глутамат, глутамин, глицин, пролин, серин, тирозин, аргинин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан и валин. Дополнительные примеры подходящих аминокислот включают, но не ограничиваются этим, омитин, гипузин, 2-аминоизомасляную кислоту, дегидроаланин, гамма-аминомасляную кислоту, цитруллин, бета-аланин, альфа-этилглицин, альфа-пропилглицин и норлейцин.

[0118] Термины "*антитело*", "*иммуноглобулин*" и "*Ig*" используются взаимозаменяемо в настоящей заявке, используются в самом широком смысле и конкретно охватывают, например, отдельные моноклональные антитела (включая

агонистические, антагонистические, нейтрализующие антитела, полноразмерные или интактные моноклональные антитела), композиции антител с полиэпитопной или моноэпитопной специфичностью, поликлональные или моновалентные антитела, мультивалентные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, одноцепочечные антитела и фрагменты антител. Антитело может быть человеческим, гуманизированным, химерным и/или антителом с созревшей аффинностью, а также антителом других видов, например, мышинным и кроличьим.

[0119] Термин «антитело» предназначен для включения полипептидного продукта В-клеток из полипептидов класса иммуноглобулинов, который способен связываться со специфическим антигеном и состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну тяжелую цепь (около 50-70 кДа) и одну легкую цепь (около 25 кДа), и каждая аминоконцевая часть каждой цепи включает переменную область, содержащую от около 100 до около 130 или более аминокислот, и каждая карбокси-концевая часть каждой цепи включает константную область. См. *Vogrebaeck (ed.) (1995) Antibody Engineering, Second Ed., Oxford University Press.; Kuby (1997) Immunology, Third Ed., W.H. Freeman and Company, New York.* Антитела также включают, но не ограничиваются этим, синтетические антитела, моноклональные антитела, рекомбинантные антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, верблюжьи антитела, химерные антитела, внутриклеточные антитела, антиидиотипические (анти-Id) антитела и их функциональные фрагменты, которые относятся к части полипептида тяжелой или легкой цепи антитела, которая сохраняет некоторую или всю связывающую активность антитела, из которого происходит этот фрагмент. Неограничивающие примеры функциональных фрагментов антитела включают одноцепочечные Fv (scFv) (например, включая моноспецифические или биспецифические), Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, F(ab)<sub>2</sub>-фрагменты, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, дисульфид-связанные Fv (sdFv), Fd-фрагменты, Fv-фрагменты, scRv-Fc, нанотела, диатела, триатела, тетратела и миниантитела. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-вариант, который имеет пониженную или устраненную эффекторную функцию. В частности, антитела по настоящему изобретению включают молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, например, антигенсвязывающие домены или молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном (например, одну или несколько определяющих комплементарность областей (CDR) анти-CD56 антитела или анти-SIRPα антитела). Такие фрагменты антител описаны, например, в *Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); Myers (ed.), Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, New York: VCH Publisher, Inc.; Huston et al., Cell Biophysics 1993, 22, 189-224; Plückthun and Skerra, Meth. Enzymol. 1989, 178, 497-515; and Day, Advanced Immunochemistry, Second Ed., Wiley-*



Liss, Inc., New York, NY (1990). Антитела, представленные в настоящей заявке, могут быть любого типа (*например*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), любого класса (*например*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2), или любого подкласса (*например*, IgG2a и IgG2b) молекулы иммуноглобулина.

[0120] Термин “*антиген*” относится к заранее определенной мишени, с которой антитело может селективно связываться. Целевой антиген может представлять собой полипептид, углевод, нуклеиновую кислоту, липид, гаптен или его фрагмент или другое встречающееся в природе или синтетическое соединение. В одном варианте осуществления целевой антиген представляет собой полипептид.

[0121] Термины «*антигенсвязывающий фрагмент*», «*антигенсвязывающий домен*» и «*антигенсвязывающая область*» относятся к части антитела, которая содержит аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с антигеном (*например*, полипептидом, углеводом, нуклеиновой кислотой, липидом, гаптеном или его фрагментом, или другим природным или синтетическим соединением) и придают связывающему агенту его специфичность и сродство к антигену (*например*, определяющие комплементарность области (CDR)).

[0122] Термин “*специфическое связывание*”, “*специфически связывается с*” или “*специфический в отношении*” определенного полипептида или эпитопа на определенной полипептидной мишени может представлять собой свойство, демонстрируемое, *например*, молекулой (*например*, антителом), имеющей константу диссоциации ( $K_d$ ) для мишени по меньшей мере около  $10^{-4}$  М, по меньшей мере около  $10^{-5}$  М, по меньшей мере около  $10^{-6}$  М, по меньшей мере около  $10^{-7}$  М, по меньшей мере около  $10^{-8}$  М, по меньшей мере около  $10^{-9}$  М, по меньшей мере около  $10^{-10}$  М, по меньшей мере около  $10^{-11}$  М или по меньшей мере около  $10^{-12}$  М. В одном варианте осуществления термин “*специфическое связывание*” относится к связыванию, где молекула связывается с определенным полипептидом или эпитопом на определенном полипептиде, по существу не связываясь с каким-либо другим полипептидом или эпитопом на полипептиде.

[0123] 4-цепочечная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. В случае IgG 4-цепочечная единица обычно составляет около 150000 дальтон. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изотипа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также имеет регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая H-цепь имеет на N-конце варибельный домен (VH), за которым следуют три константных домена (CH) для каждой из  $\alpha$ - и  $\gamma$ -цепей и четыре CH-домена для изотипов  $\mu$  и  $\epsilon$ . Каждая L-цепь имеет на N-конце варибельный домен (VL), за которым следует константный домен (CL) на другом ее конце. VL выровнен с VH, а CL выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи (CH1). Полагают, что определенные аминокислотные остатки образуют границу раздела между варибельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

Спаривание VH и VL вместе образует единый антигенсвязывающий сайт. Структуру и свойства различных классов антител см., например, в Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Stites *et al.* (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6.

[0124] Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к части легкой или тяжелой цепи антитела, которая обычно расположена на amino-конце легкой или тяжелой цепи и имеет длину примерно от 120 до 130 аминокислот в тяжелой цепи и примерно от 100 до 110 аминокислот в легкой цепи и используются для связывания и специфичности каждого конкретного антитела к его конкретному антигену. Вариабельная область тяжелой цепи может обозначаться как «VH». Вариабельная область легкой цепи может обозначаться как «VL». Термин «вариабельный» относится к тому факту, что определенные сегменты вариабельных областей сильно различаются по последовательности среди антител. V-область опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. Однако вариабельность неравномерно распределяется в 110-аминокислотном диапазоне вариабельных областей. Вместо этого V-области состоят из менее вариабельных (например, относительно инвариантных) участков, называемых каркасными областями (FR), состоящими примерно из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями с большей вариабельностью (например, крайней вариабельностью), называемыми «гипервариабельными областями», каждая из которых имеет длину около 9-12 аминокислот. Каждая из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей содержит по четыре FR, в основном в конфигурации  $\beta$ -листа, соединенных тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющиеся со структурой  $\beta$ -листа, а в некоторых случаях образующие ее часть. Гипервариабельные участки в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости посредством FR и вместе с гипервариабельными участками из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител (см., например, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)). Константные области не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Вариабельные области сильно различаются по последовательности между разными антителами. Вариабельность последовательности сосредоточена в CDR, тогда как менее вариабельные части вариабельной области называются каркасными областями (FR). CDR легкой и тяжелой цепей в первую очередь ответственны за взаимодействие антитела с антигеном. В конкретных вариантах осуществления вариабельная область представляет собой вариабельную область человека.

[0125] Термин «*нумерация остатков вариабельной области в соответствии с Kabat*» или «*нумерация аминокислотных положений в соответствии с Kabat*» и его варианты относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных областей тяжелых цепей или вариабельных областей легких цепей при компиляции антител в Kabat

et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). При использовании этой системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительные аминокислоты, что соответствует укорочению или вставке в FR или CDR варибельного домена. Например, варибельный домен тяжелой цепи может включать вставку одной аминокислоты (остаток 52a по Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. по Kabat) после остатка 82 в FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания по областям гомологии последовательности антитела со «стандартной» последовательностью, пронумерованной в соответствии с Kabat. Система нумерации Kabat обычно используется при ссылке на остаток в варибельном домене (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). «Система нумерации EU» или «EU-индекс» обычно используются при ссылке на остаток в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, EU-индекс, указанный в Kabat et al., см. выше). «EU-индекс в соответствии с Kabat» относится к нумерации остатков человеческого IgG 1 EU антитела. Были описаны и другие системы нумерации, включая, например, AbM, Chothia, Contact, IMGT и ANon.

[0126] “*Интактное*” антитело представляет собой антитело, включающее антигенсвязывающий сайт, а также CL и по меньшей мере константные области тяжелой цепи CH1, CH2 и CH3. Константные области могут включать человеческие константные области или варианты их аминокислотных последовательностей. Предпочтительно, интактное антитело имеет одну или несколько эффекторных функций.

[0127] Термин “*фрагмент антитела*” относится к части интактного антитела, предпочтительно антигенсвязывающей или варибельной области интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv фрагменты; диатела и ди-диатела (см., например, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **1993**, 90, 6444-8; Lu et al., J. Biol. Chem. **2005**, 280, 19665-72; Hudson et al., Nat. Med. **2003**, 9, 129-134; WO 93/11161; и патенты США №№ 5837242 и 6492123); молекулы одноцепочечных антител (см., например, патенты США №№ 4946778; 5260203; 5482858 и 5476786); антитела с двойными варибельным доменом (см., например, патент США № 7612181); антитела с единственным варибельным доменом (SdAb) (см., например, Woolven et al., Immunogenetics **1999**, 50, 98-101 Streltsov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **2004**, 101, 12444-12449); и мультиспецифическое антитела, образованные из фрагментов антител.

[0128] Термин “*функциональный фрагмент*”, “*связывающий фрагмент*” или “*антигенсвязывающий фрагмент*” антитела относится к молекуле, которая проявляет по меньшей мере одну из биологических функций, присущих интактному антителу, при этом функция включает по меньшей мере связывание с антигеном-мишенью.

[0129] Термин “*тяжелая цепь*”, когда он используется по отношению к антителу, относится к полипептидной цепи массой около 50-70 кДа, где амино-концевая часть включает переменную область из примерно 120-130 или более аминокислот и карбокси-концевая часть включает константную область. Константная область может относиться к одному из пяти различных типов (например, изотипов), называемых альфа ( $\alpha$ ), дельта ( $\delta$ ), эpsilon ( $\epsilon$ ), гамма ( $\gamma$ ) и мю ( $\mu$ ), в зависимости от аминокислотной последовательности константной области тяжелой цепи. Отдельные тяжелые цепи различаются по размеру:  $\alpha$ ,  $\delta$  и  $\gamma$  содержат примерно 450 аминокислот, а  $\mu$  и  $\epsilon$  содержат примерно 550 аминокислот. В сочетании с легкой цепью эти отдельные типы тяжелых цепей дают пять хорошо известных классов (например, изотипов) антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, включая четыре подкласса IgG, а именно IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Тяжелая цепь может представлять собой тяжелую цепь человека.

[0130] Термин “*легкая цепь*”, когда он используется по отношению к антителу, относится к полипептидной цепи массой около 25 кДа, где амино-концевая часть включает переменную область из примерно 100-110 или более аминокислот и карбокси-концевая часть включает константную область. Примерная длина легкой цепи составляет от 211 до 217 аминокислот. Существует два различных типа, называемых каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ), в соответствии с аминокислотной последовательностью константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области. Легкая цепь может представлять собой легкую цепь человека.

[0131] Термин “*моноклональное антитело*” используемый в настоящей заявке, относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, например, отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах, и каждое моноклональное антитело обычно распознает один эпитоп антигена. В конкретных вариантах осуществления «моноклональное антитело» в контексте настоящей заявки представляет собой антитело, продуцируемое одной гибридомой или другой клеткой, где антитело связывается только с эпитопом бета-клетки, как определено, например, с использованием ELISA или другого анализа связывания антигена или конкурентного связывания, известного в данной области. Термин “моноклональный” не ограничивается каким-либо конкретным методом получения антитела. Например, моноклональные антитела, полезные в настоящем изобретении, можно получить гибридомным методом, впервые описанным Kohler et al., Nature 1975, 256, 495; или они могут быть получены с использованием методов рекомбинантной ДНК в бактериальных, эукариотических клетках животных или растений (см., например, патент США № 4816567). «Моноклональные антитела» также можно выделить из фаговых библиотек антител с использованием методов, описанных, например, в Clackson et al., Nature 1991, 352, 624-628 и Marks et al., J. Mol. Biol. 1991, 222, 581-597. Другие способы получения клональных клеточных линий и экспрессируемых ими моноклональных антител хорошо известны в данной области (см., например, главу 11 в: Short Protocols in

Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel *et al.*, eds., John Wiley и Sons, New York). Иллюстративные способы получения моноклональных антител представлены в примерах настоящей заявки.

[0132] “Гуманизированные” формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые включают иммуноглобулины человека (например, реципиентное антитело), в которых нативные остатки CDR заменены остатками соответствующих CDR нечеловеческого вида (например, донорного антитела), такого как мышь, крыса, кролик или примат, не являющийся человеком, с желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. В некоторых случаях один или несколько остатков FR-области человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут включать остатки, которые не присутствуют ни в реципиентном антителе, ни в донорном антителе. Эти модификации осуществляют для дальнейшего улучшения эффективности антител. Тяжелая или легкая цепь гуманизированного антитела может содержать по существу все из по меньшей мере одной или нескольких переменных областей, в которых все или по существу все CDR соответствуют CDR нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по существу все FR происходят из последовательности человеческого иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело будет содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, обычно иммуноглобулина человека. Более подробную информацию см. в Jones *et al.*, *Nature* 1986, 321, 522-525; Riechmann *et al.*, *Nature* 1988, 332, 323-329; Presta, *Curr. Opin. Biotechnol.* 1992, 3, 394-398; Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, 89, 4285-4289; и патентах США №№: 6800738, 6719971, 6639055, 6407213 и 6054297.

[0133] “Человеческое антитело” представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, которая соответствует последовательности антитела, продуцируемого человеком, и/или которое было получено с использованием любого из способов получения человеческих антител, раскрытых в настоящей заявке. Это определение человеческого антитела конкретно исключает гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки. Человеческие антитела могут быть получены с использованием различных методов, известных в данной области техники, включая библиотеки фагового дисплея (Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 1991, 227, 381; Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 1991, 222, 581) и библиотеки дрожжевого дисплея (Chao *et al.*, *Nature Protocols* 2006, 1, 755-768). Для получения человеческих моноклональных антител также доступны способы, описанные в Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.* 1991, 147, 86-95. См. также van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2001, 5, 368-374. Человеческие антитела можно получить путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на антигенное воздействие, но чьи эндогенные локусы были отключены, например, мышам

(см., например, Jakobovits, Curr. Opin. Biotechnol. 1995, 6, 561-566, Brüggemann and Taussing, Curr. Opin. Biotechnol. 1997, 8, 455-458 и патенты США №№ 6075181 и 6150584, касающиеся технологии XENOMOUSE™). См. также, например, Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006, 103, 3557-3562, что касается человеческих антител, полученных с использованием гибридной технологии В-клеток человека.

[0134] “CDR” относится к одной из трех гипервариабельных областей (H1, H2 или H3) в пределах некаркасной области β-листового каркаса VH иммуноглобулина (Ig или антитела) или к одной из трех гипервариабельных областей (L1), L2 или L3) в пределах некаркасной области β-листового каркаса VL антитела. Соответственно, CDR представляют собой последовательности вариабельных областей, вкрапленные в последовательности каркасных областей. Области CDR хорошо известны специалистам в данной области и были определены, например, Kabat как области наибольшей гипервариабельности в пределах вариабельных (V) доменов антитела. Kabat et al., J. Biol. Chem. 1977, 252, 6609-6616; Kabat, Adv. Protein Chem. 1978, 32, 1-75. Последовательности областей CDR также были структурно определены Chothia как те остатки, которые не являются частью консервативного β-листового каркаса и, таким образом, способны адаптировать различные конформации. Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 1987, 196, 901-917. Обе терминологии хорошо известны в данной области техники. Последовательности областей CDR также были определены в соответствии с AbM, Contact и IMGT. Положения CDR в канонической вариабельной области антитела были определены путем сравнения многочисленных структур. Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 1997, 273, 927-948; Morea et al., Methods. 2000, 20, 267-279. Поскольку количество остатков в гипервариабельной области варьируется в разных антителах, дополнительные остатки относительно канонических положений обычно нумеруются буквами a, b, c и т.д. рядом с номером остатка в схеме нумерации канонической вариабельной области. Al-Lazikani et al., supra (1997). Такая номенклатура также хорошо известна специалистам в данной области.

[0135] Термин “Fc-область” в настоящей заявке используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая, например, Fc-области нативной последовательности, рекомбинантные Fc-области и варианты Fc-области. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG часто определяется как простирающаяся от аминокислотного остатка в положении Cys226, или от Pro230, до ее карбокси-конца. C-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с EU-системой нумерации) Fc-области может быть удален, например, в процессе получения или очистки антитела, или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиции интактных антител могут включать популяции антител, где все K447 остатки удалены, популяции антител, где не удален никакой K447 остаток, и популяции антител, содержащие смесь антител с K447 остатком или без него.

[0136] “Циклоалкил” означает неароматическое полностью насыщенное карбоциклическое кольцо, имеющее указанное количество атомов углерода, например, 3-

10, или 3-8, или 3-6 кольцевых атомов углерода. Циклоалкильные группы могут быть моноциклическими или полициклическими (например, бициклическими, трициклическими). Примеры циклоалкильных групп включают циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил, а также связанные мостиковой связью и изолированные кольцевые группы (например, норборнан, бицикло[2.2.2]октан). Кроме того, одно кольцо полициклической циклоалкильной группы может быть ароматическим, при условии, что полициклическая циклоалкильная группа связана с исходной структурой через неароматический углерод. Например, 1,2,3,4-тетрагидронафтаден-1-ильная группа (где группа связана с исходной структурой через неароматический атом углерода) представляет собой циклоалкильную группу, тогда как 1,2,3,4-тетрагидронафтаден-5-ил (где группа связана с исходной структурой через ароматический атом углерода) не считается циклоалкильной группой. Примеры полициклических циклоалкильных групп, состоящих из циклоалкильной группы, конденсированной с ароматическим кольцом, описаны ниже.

[0137] "*Циклоалкенил*" означает неароматическое карбоциклическое кольцо, содержащее указанное количество атомов углерода (например, 3-10, или 3-8, или 3-6 кольцевых атомов углерода) и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Циклоалкенильные группы могут быть моноциклическими или полициклическими (например, бициклическими, трициклическими). Примеры циклоалкенильных групп включают циклопропенил, циклобутенил, циклопентенил, циклопентадиенил и циклогексенил, а также связанные мостиковой связью и изолированные кольцевые группы (например, бицикло[2.2.2]октен). Кроме того, одно кольцо полициклической циклоалкенильной группы может быть ароматическим, при условии, что полициклическая алкенильная группа связана с исходной структурой через неароматический атом углерода. Например, инден-1-ил (где группа связана с исходной структурой через неароматический атом углерода) считается циклоалкенильной группой, тогда как инден-4-ил (где группа связана с исходной структурой через ароматический атом углерода) не считается циклоалкенильной группой. Примеры полициклических циклоалкенильных групп, состоящих из циклоалкенильной группы, конденсированной с ароматическим кольцом, описаны ниже.

[0138] "*Циклоалкинил*" относится к ненасыщенной углеводородной группе в циклоалкиле, имеющей по меньшей мере один участок ацетиленовой ненасыщенности (т.е. имеющей по меньшей мере одну группу формулы  $C\equiv C$ ). Циклоалкинил может состоять из одного кольца, такого как циклооктин, или из нескольких колец. Один циклоалкинильный фрагмент представляет собой ненасыщенный циклический углеводород, имеющий от 5 до 10 кольцевых атомов углерода (« $C_5$ - $C_{10}$  циклоалкинил»). Примеры включают циклопентин, циклогексин, циклогептин, циклооктин, циклононин и т.п.

[0139] "*Арил*" означает ароматическое карбоциклическое кольцо, имеющее указанное количество атомов углерода, например, 6-12 или 6-10 атомов углерода.

Арильные группы могут быть моноциклическими или полициклическими (например, бициклическими, трициклическими). В некоторых случаях оба кольца полициклической арильной группы являются ароматическими (например, нафтил). В других случаях, полициклические арильные группы могут включать неароматическое кольцо, конденсированное с ароматическим кольцом, при условии, что полициклическая арильная группа связана с исходной структурой через атом в ароматическом кольце. Таким образом, 1,2,3,4-тетрагидронафтаден-5-ильная группа (где группа связана с исходной структурой через ароматический атом углерода) считается арильной группой, тогда как 1,2,3,4-тетрагидронафтаден-1-ил (где группа связана с исходной структурой через неароматический атом углерода) не считается арильной группой. Подобным образом, 1,2,3,4-тетрагидрохинолин-8-ильная группа (где группа связана с исходной структурой через ароматический атом углерода) считается арильной группой, тогда как 1,2,3,4-тетрагидрохинолин-1-ильная группа (где группа связана с исходной структурой через неароматический атом азота) не считается арильной группой. Однако, термин “арил” не охватывает “гетероарил”, как он определен в настоящей заявке, и не перекрывается с ним, независимо от точки присоединения (например, оба хинолин-5-ил и хинолин-2-ил являются гетероарильными группами). В некоторых случаях арил представляет собой фенил или нафтил. В некоторых случаях арил представляет собой фенил. Дополнительные примеры арильных групп, включающих ароматическое углеродное кольцо, конденсированное с неароматическим кольцом, описаны ниже.

[0140] Термин “*DAR*” относится к отношению лекарственное средство:антитело в конъюгате олигонуклеотид-антитело, более конкретно к отношению иммуномодулирующий олигонуклеотид:антитело. В некоторых случаях, например, конъюгат олигонуклеотид-антитело может быть описан в настоящей заявке как имеющий  $DAR=1$ , или как  $DAR1$  конъюгат, где соотношение олигонуклеотид:антитело составляет 1:1. В других случаях конъюгат олигонуклеотид-антитело может быть описан в настоящей заявке как имеющий  $DAR=2$ , или как  $DAR2$  конъюгат, где соотношение олигонуклеотид:антитело составляет 2:1.

[0141] “*Гетероарил*” означает ароматическое кольцо, содержащее указанное количество атомов (например, 5-12- или 5-10-членный гетероарил), включая один или несколько гетероатомов (например, 1, 2, 3 или 4 гетероатома), выбранных из N, O и S, при этом остальные кольцевые атомы представляют собой углерод. Гетероарильные группы не содержат смежные атомы S и O. В некоторых вариантах осуществления общее количество S и O атомов в гетероарильной группе составляет не более 2. В некоторых вариантах осуществления общее количество S и O атомов в гетероарильной группе составляет не более 1. Если не указано иное, гетероарильные группы могут быть связаны с исходной структурой посредством атома углерода или азота, как позволяет валентность. Например, “пиридил” включает группы 2-пиридил, 3-пиридил и 4-пиридил, а “пирролил” включает группы 1-пирролил, 2-пирролил и 3-пирролил.

[0142] В некоторых случаях гетероарильная группа является моноциклической.



Примеры включают пиррол, пиразол, имидазол, триазол (например, 1,2,3-триазол, 1,2,4-триазол, 1,2,4-триазол), тетразол, фуран, изоксазол, оксазол, оксадиазол (например, 1,2,3-оксадиазол, 1,2,4-оксадиазол, 1,3,4-оксадиазол), тиофен, изотиазол, тиазол, тиадиазол (например, 1,2,3-тиадиазол, 1,2,4-тиадиазол, 1,3,4-тиадиазол), пиридин, пиридазин, пиримидин, пиразин, триазин (например, 1,2,4-триазин, 1,3,5-триазин) и тетразин.

[0143] В некоторых случаях оба кольца полициклической гетероарильной группы являются ароматическими. Примеры включают индол, изоиндол, индазол, бензоимидазол, бензотриазол, бензофуран, бензоксазол, бензоизоксазол, бензоксадиазол, бензотиофен, бензотиазол, бензоизотиазол, бензотиадиазол, 1Н-пирроло[2,3-*b*]пиридин, 1Н-пиразоло[3,4-*b*]пиридин, 3Н-имидазо[4,5-*b*]пиридин, 3Н-[1,2,3]триазоло[4,5-*b*]пиридин, 1Н-пирроло[3,2-*b*]пиридин, 1Н-пиразоло[4,3-*b*]пиридин, 1Н-имидазо[4,5-*b*]пиридин, 1Н-[1,2,3]триазоло[4,5-*b*]пиридин, 1Н-пирроло[2,3-*c*]пиридин, 1Н-пиразоло[3,4-*c*]пиридин, 3Н-имидазо[4,5-*c*]пиридин, 3Н-[1,2,3]триазоло[4,5-*c*]пиридин, 1Н-пирроло[3,2-*c*]пиридин, 1Н-пиразоло[4,3-*c*]пиридин, 1Н-имидазо[4,5-*c*]пиридин, 1Н-[1,2,3]триазоло[4,5-*c*]пиридин, фуро[2,3-*b*]пиридин, оксазоло[5,4-*b*]пиридин, изоксазоло[5,4-*b*]пиридин, [1,2,3]оксадиазоло[5,4-*b*]пиридин, фуро[3,2-*b*]пиридин, оксазоло[4,5-*b*]пиридин, изоксазоло[4,5-*b*]пиридин, [1,2,3]оксадиазоло[4,5-*b*]пиридин, фуро[2,3-*c*]пиридин, оксазоло[5,4-*c*]пиридин, изоксазоло[5,4-*c*]пиридин, [1,2,3]оксадиазоло[5,4-*c*]пиридин, фуро[3,2-*c*]пиридин, оксазоло[4,5-*c*]пиридин, изоксазоло[4,5-*c*]пиридин, [1,2,3]оксадиазоло[4,5-*c*]пиридин, тиено[2,3-*b*]пиридин, тиазоло[5,4-*b*]пиридин, изотиазоло[5,4-*b*]пиридин, [1,2,3]тиадиазоло[5,4-*b*]пиридин, тиено[3,2-*b*]пиридин, тиазоло[4,5-*b*]пиридин, изотиазоло[4,5-*b*]пиридин, [1,2,3]тиадиазоло[4,5-*b*]пиридин, тиено[2,3-*c*]пиридин, тиазоло[5,4-*c*]пиридин, изотиазоло[5,4-*c*]пиридин, [1,2,3]тиадиазоло[5,4-*c*]пиридин, тиено[3,2-*c*]пиридин, тиазоло[4,5-*c*]пиридин, изотиазоло[4,5-*c*]пиридин, [1,2,3]тиадиазоло[4,5-*c*]пиридин, хинолин, изохинолин, циннолин, хиназолин, хиноксалин, фталазин, нафтиридин (например, 1,8-нафтиридин, 1,7-нафтиридин, 1,6-нафтиридин, 1,5-нафтиридин, 2,7-нафтиридин, 2,6-нафтиридин), имидазо[1,2-*a*]пиридин, 1Н-пиразоло[3,4-*d*]тиазол, 1Н-пиразоло[4,3-*d*]тиазол и имидазо[2,1-*b*]тиазол.

[0144] В других случаях полициклические гетероарильные группы могут включать неароматическое кольцо (например, циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклоалкил, гетероциклоалкенил), конденсированное с гетероарильным кольцом, при условии, что полициклическая гетероарильная группа связана с исходной структурой через атом в ароматическом кольце. Например, 4,5,6,7-тетрагидробензо[*d*]тиазол-2-ильная группа (где группа связана с исходной структурой через ароматический атом углерода) считается гетероарильной группой, тогда как 4,5,6,7-тетрагидробензо[*d*]тиазол-5-ил (где группа связана с исходной структурой через неароматический атом углерода) не считается гетероарильной группой. Примеры полициклических гетероарильных групп, состоящих из гетероарильного кольца, конденсированного с неароматическим кольцом, описаны ниже.

[0145] Используемые в настоящей заявке термины “включая”, “содержащий” и

“включающий” используются в их открытом, неограничивающем смысле. Также должно быть понятно, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные в настоящей заявке могут включать “состоящий” и/или “состоящий по существу из” аспекты и варианты осуществления.

[0146] Должно быть понятно, что независимо от того, используется ли термин “около” явно или нет, каждая величина, приведенная в настоящей заявке, предназначена для обозначения фактического указанного значения, а также для обозначения приближения к такому указанному значению, которое может быть обоснованно выведено на основе обычного опыта в данной области техники, включая эквиваленты и приближения, обусловленные условиями эксперимента и/или измерений для такого заданного значения.

[0147] Используемый в настоящей заявке термин “носитель” включает фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, которые нетоксичны для клеток или млекопитающих, подвергающихся их воздействию в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный рН-буферный раствор. Неограничивающие примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (менее чем примерно 10 остатков) полипептид; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™.

[0148] Используемый в настоящей заявке термин “эффективное количество” или “терапевтически эффективное количество” вещества представляет собой, по меньшей мере, минимальную концентрацию, необходимую для достижения измеримого улучшения или предотвращения конкретного расстройства. Эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса тела пациента, а также способность вещества вызывать желаемый ответ у индивидуума. Эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты лечения перевешиваются терапевтически полезными эффектами. Что касается рака, эффективное количество включает количество, достаточное для того, чтобы вызвать сокращение опухоли и/или уменьшить скорость роста опухоли (например, подавить рост опухоли) или предотвратить или задержать другую нежелательную клеточную пролиферацию при раке. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, достаточное для задержки развития рака. В некоторых вариантах осуществления

эффективное количество представляет собой количество, достаточное для предотвращения или задержки рецидива. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, достаточное для снижения частоты рецидивов у индивидуума. Эффективное количество можно вводить за один или несколько приемов. Эффективное количество лекарственного средства или композиции может: (i) уменьшать количество раковых клеток; (ii) уменьшать размер опухоли; (iii) ингибировать, задерживать, замедлять в некоторой степени и предпочтительно останавливать инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; (v) ингибировать рост опухоли; (vi) предотвращать или задерживать возникновение и/или рецидив опухоли; (vii) снижать частоту рецидивов опухоли и/или (viii) облегчать в некоторой степени один или несколько симптомов, связанных с раком. Эффективное количество можно вводить за один или несколько приемов. Для целей настоящего изобретения эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для осуществления профилактического или терапевтического лечения прямо или косвенно. Как понятно в клиническом контексте, эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может достигаться, или не достигаться, в сочетании с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, «эффективное количество» можно рассматривать в контексте введения одного или нескольких терапевтических средств, и можно считать, что одно средство вводится в эффективном количестве, если в сочетании с одним или несколькими другими средствами может достигаться желаемый результат.

[0149] “Вкладыш в упаковку” относится к инструкциям, обычно включаемым в коммерческие упаковки лекарственных средств, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и других лекарственных средствах, применяемых в комбинации с упакованным продуктом, и/или предупреждения, касающиеся использования таких лекарств и т.д.

[0150] Термины “белок”, “полипептид” и “пептид” используются здесь для обозначения полимеров, состоящих из аминокислот, любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться неаминокислотными фрагментами. Эти термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства; например, путем образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или любых других манипуляций или модификаций, таких как конъюгация с метящим компонентом. Обычно белок, используемый в настоящем изобретении, будет иметь молекулярную массу по меньшей мере примерно 5-20 кДа, альтернативно, по меньшей мере примерно 20-100 кДа или по меньшей мере примерно 100 кДа. Определение также включает, например, белки,

содержащие один или несколько аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные в данной области техники.

[0151] “*Фармацевтически приемлемая соль*” представляет собой форму соли, которая является нетоксичной, биологически переносимой или иным образом биологически подходящей для введения субъекту. См. в основном, Berge et al.(1977) *J. Pharm. Sci.* 66, 1. Особыми фармацевтически приемлемыми солями являются те, которые фармакологически эффективны и подходят для контакта с тканями субъектов без чрезмерной токсичности, раздражения или аллергической реакции. Фармацевтически приемлемые соли включают, без ограничения, кислотно-аддитивные соли, образованные неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и т.п.; или образованные органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, пропионовая кислота, янтарная кислота, малеиновая кислота, винная кислота и т.п. Эти соли могут быть получены из неорганических или органических кислот. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых солей включают сульфаты, пиросульфаты, бисульфаты, сульфиты, бисульфиты, фосфаты, моногидрофосфаты, дигидрофосфаты, метафосфаты, пирофосфаты, хлориды, бромиды, йодиды, ацетаты, пропионаты, деканоаты, каприлаты, акрилаты, формиаты, изобутираты, капроаты, гептаноаты, пропиолаты, оксалаты, малонаты, сукцинаты, субераты, себацинаты, fumarаты, малеаты, бутин-1,4-диоаты, гексин-1,6-диоаты, бензоаты, хлорбензоаты, метилбензоаты, динитробензоаты, гидроксibenзоаты, метоксибензоаты, фталаты, сульфонаты, метилсульфонаты, пропилсульфонаты, безилаты, ксилолсульфонаты, нафталин-1-сульфонаты, нафталин-2-сульфонаты, фенилацетаты, фенилпропионаты, фенилбутираты, цитраты, лактаты,  $\gamma$ -гидроксibuтираты, гликоляты, тартраты и манделаты. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли образуются, когда кислотный протон, присутствующий в исходном соединении, заменяется ионом металла, например, ионом щелочного металла, ионом щелочноземельного металла или ионом алюминия; или координируется с органическим основанием. Соли, полученные из фармацевтически приемлемых органических нетоксичных оснований, включают, без ограничения, соли первичных, вторичных и третичных аминов, замещенных аминов, включая встречающиеся в природе замещенные амины, циклических аминов и основных ионообменных смол, таких как изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, 2-диэтиламиноэтанол, трометамин, триметанин, дициклогексиламин, кофеин, новокаин, гидрабамин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, N-этилглюкамин, N-метилглюкамин, теобромин, пурины, пиперазин, пиперидин, N-этилпиперидин, полиаминовые смолы, аминокислоты, такие как лизин, аргинин, гистидин и т.п. Примеры фармацевтически приемлемых солей присоединения оснований включают соли, полученные из неорганических оснований, такие как соли натрия, калия, лития, аммония,

кальция, магния, железа, цинка, меди, марганца, алюминия и т.п. В некоторых вариантах осуществления органическими нетоксичными основаниями являются L-аминокислоты, такие как L-лизин и L-аргинин, трометамин, N-этилглюкамин и N-метилглюкамин. Приемлемые неорганические основания включают, без ограничения, гидроксид алюминия, гидроксид кальция, гидроксид калия, карбонат натрия, гидроксид натрия и т.п. Перечни других подходящих фармацевтически приемлемых солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985.

[0152] «Сольват» образуется в результате взаимодействия растворителя и соединения. Подходящие растворители включают, например, воду и спирты (например, этанол). Сольваты включают гидраты, имеющие любое соотношение соединения и воды, такие как моногидраты, дигидраты и полугидраты.

[0153] «Субъект», «пациент» или «индивидуум» включает млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно является человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект, например пациент, которому вводят терапевтические средства и композиции, является млекопитающим, обычно приматом, таким как человек. В некоторых вариантах осуществления примат представляет собой обезьяну или человекообразную обезьяну. Субъектом может быть мужчина или женщина любого подходящего возраста, включая младенцев, несовершеннолетних, подростков, взрослых и гериатрических субъектов. В некоторых вариантах осуществления субъектом является млекопитающее, не являющееся приматом, такое как грызун, собака, кошка, сельскохозяйственное животное, такое как корова или лошадь и т.д.

[0154] Термин «рак» или «опухоль» относится к присутствию клеток, обладающих характеристиками, типичными для клеток, вызывающих рак, такими как неконтролируемая пролиферация, способность к неограниченной пролиферации, метастатический потенциал, быстрый рост и скорость пролиферации, а также определенные характерные морфологические особенности. Раковые клетки часто имеют форму солидной опухоли, которую можно обнаружить по опухолевой массе, например, с использованием таких процедур, как компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, рентген, ультразвук или пальпация, и/или которую можно обнаружить по экспрессии одного или нескольких рак-специфических антигенов в образце, полученном от пациента. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль не обязательно должна иметь измеримые размеры. Раковые клетки могут также иметь форму жидкой опухоли, причем раковые клетки могут существовать отдельно или могут быть диссеминированы в организме животного. В настоящее время термины «диссеминированная опухоль» и «жидкая опухоль» используются взаимозаменяемо и включают, помимо прочего, лейкоз и лимфому и другие виды рака клеток крови.

[0150] Термин «лейкоз» относится к типу рака крови или костного мозга, характеризующемуся аномальным увеличением незрелых лейкоцитов, называемых «бластами». Лейкоз - это широкий термин, охватывающий целый спектр заболеваний. В

свою очередь, это часть еще более широкой группы заболеваний, поражающих кровь, костный мозг и лимфоидную систему, известных как гематологические новообразования. Лейкозы можно разделить на четыре основных типа: острый лимфоцитарный (или лимфобластный) лейкоз (ALL), острый миелогенный (или миелоидный или нелимфатический) лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелогенный лейкоз (CMML). Другие типы лейкоза включают волосистоклеточный лейкоз (HCL), Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), крупнозернистый лимфоцитарный лейкоз и Т-клеточный лейкоз взрослых.

[0156] Термин «лимфома» относится к группе опухолей клеток крови, которые развиваются из лимфатических клеток. Двумя основными категориями лимфом являются лимфомы Ходжкина (HL) и неходжкинские лимфомы (NHL). Лимфомы включают любые новообразования лимфатических тканей. Основными классами являются раковые заболевания лимфоцитов, типа лейкоцитов, которые принадлежат как к лимфе, так и к крови и проникают в них.

[0157] Используемый в настоящей заявке, термин “рак” включает как предзлокачественные, так и злокачественные виды рака, а также включает первичные опухоли (например, клетки которых не мигрировали в другие участки тела субъекта, кроме места исходной опухоли) и вторичные опухоли (например, возникающие в результате метастазирования, миграции опухолевых клеток во вторичные участки, отличные от места исходной опухоли), рецидивирующий рак и рефрактерный рак.

[0158] Термины «повторное проявление рака» и «рецидив рака» используются как взаимозаменяемые и относятся к возвращению признака, симптома или заболевания после ремиссии. Рецидивирующие раковые клетки могут вновь появиться в том же месте первичной опухоли или в другом месте, например, при вторичном раке. Раковые клетки могут вновь появиться в той же болезненной форме, что и первичный рак, или в другой болезненной форме. Например, в некоторых вариантах осуществления первичный рак представляет собой солидную опухоль, а рецидивирующий рак представляет собой жидкую опухоль. В других вариантах осуществления первичный рак представляет собой жидкую опухоль, а рецидивирующий рак представляет собой солидную опухоль. В других вариантах осуществления как первичный рак, так и рецидивирующий рак представляют собой солидные опухоли или оба представляют собой жидкие опухоли. В некоторых вариантах осуществления рецидивирующая опухоль экспрессирует по меньшей мере один опухоль-ассоциированный антиген, который также экспрессируется первичной опухолью.

[0159] Термин «рефрактерный рак», используемый в настоящей заявке, относится к раку, который не реагирует на лечение, например, раку, устойчивому в начале лечения (например, лечению иммунотерапией), или раку, который может становиться устойчивыми во время лечения. Термины «отвечать», «ответ» или «респонсивность» относятся к противораковому ответу, в смысле, например, уменьшения размера опухоли или ингибирования роста опухоли. Эти термины также могут относиться к улучшенному прогнозу, например, что отражается в увеличении времени до рецидива, т.е. периода до

первого цензурирования рецидива для второго первичного рака как первого события или смерти без признаков рецидива, или в увеличении общей выживаемости, то есть периода от лечения до смерти от любой причины. Отвечать или иметь ответ означает, что при воздействии стимула достигается полезная конечная точка. Альтернативно, негативный или вредный симптом минимизируется, смягчается или ослабляется при воздействии стимула. Следует понимать, что оценка вероятности того, что опухоль или субъект проявит благоприятный ответ, эквивалентна оценке вероятности того, что опухоль или субъект не проявит благоприятный ответ (т.е. будут демонстрировать отсутствие ответа или не будут реагировать).

[0160] В контексте настоящей заявки раковые заболевания включают, но не ограничиваются этим, меланомы, рак молочной железы, рак легких, рак бронхов, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак головного мозга или центральной нервной системы, рак периферической нервной системы, рак пищевода, рак шейки матки, рак матки или эндометрия, рак полости рта или глотки, рак печени, рак почки, тестикулярный рак, рак желчевыводящих путей, рак тонкой кишки или аппендикса, рак слюнной железы, рак щитовидной железы, рак надпочечников, остеосаркому, хондросаркому, рак гематологических тканей, В-клеточный рак, например множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, заболевания тяжелых цепей, например, такие как болезнь альфа-тяжелых цепей, болезнь гамма-тяжелых цепей и болезнь мю-тяжелых цепей, доброкачественную моноклональную гаммапатию и иммуноцитарный амилоидоз и т.п. Другие неограничивающие примеры типов рака, для которых применимы способы, охватываемые настоящим изобретением, включают саркомы и карциномы человека, например, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, рак печени, хориокарциному, соминому, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак кости, опухоль головного мозга, тестикулярный рак, карциному легкого, мелкоклеточную карциному легких, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинелому, гемангиобластому, акустическую неврому, олигодендроглиому, менингиому, меланому, нейробластому, ретинобластому; лейкозы, например, острый лимфоцитарный лейкоз и острый миелоцитарный лейкоз (миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз); хронический

лейкоз (хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз); и истинную полицитемию, лимфому (болезнь Ходжкина и неходжкинскую болезнь), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема и болезнь тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления раковые заболевания имеют эпителиальную природу и включают, но не ограничиваются этим, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, гинекологический рак, рак почки, рак гортани, рак легких, рак полости рта, рак головы и шеи, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак кожи. В других вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы, рак предстательной железы, рак легких или рак толстой кишки. В других вариантах осуществления эпителиальный рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, непапиллярную почечно-клеточную карциному, карциному шейки матки, карциному яичника (например, серозную карциному яичника) или карциному молочной железы. Эпителиальные раковые заболевания могут быть охарактеризованы другим образом, в том числе, но не ограничиваясь этим, как серозные, эндометриоидные, муцинозные, светлоклеточные, по типу Бреннера или недифференцированные.

[0161] Термин «терапия рака» или «противораковое терапевтическое средство», используемый в настоящей заявке, относится к тем терапиям или средствам, которые могут оказывать противоопухолевый эффект или обладать противоопухолевой активностью. Такой противоопухолевый эффект или противоопухолевая активность может проявляться в виде снижения скорости пролиферации, жизнеспособности или метастатической активности опухолевых клеток. Возможным способом проявления противоопухолевой активности является демонстрация снижения скорости роста аномальных клеток, которое происходит во время терапии, или стабилизации или уменьшения размера опухоли. Такую активность можно оценить с использованием принятых моделей опухолей *in vitro* или *in vivo*, включая, но не ограничиваясь этим, модели ксенотрансплантатов, модели аллотрансплантатов, модели MMTV и другие известные модели, известные в данной области техники для исследования противоопухолевой активности.

[0162] Подразумевается, что термины «лечить», «лечащий» и «лечение» включают облегчение или устранение состояния, расстройства или заболевания, или одного или нескольких симптомов, связанных с состоянием, расстройством или заболеванием; или облегчение или устранение причины (причин) состояния, расстройства или заболевания как такового.

[0163] Термины «предотвращать», «предотвращающий» и «профилактика» включают способ задержки и/или предотвращения возникновения состояния, расстройства или заболевания и/или сопутствующих ему симптомов; предотвращение приобретения субъектом состояния, расстройства или заболевания; или снижение риска возникновения у субъекта состояния, расстройства или заболевания.

[0164] Термин «замещенный» означает, что указанная группа или фрагмент



содержит один или несколько заместителей, включая, но не ограничиваясь этим, заместители, такие как алкокси, ацил, ацилокси, алкоксикарбонил, карбонилалкокси, ациламино, amino, аминоксил, аминокарбониламино, аминокарбонилалкокси, циклоалкил, циклоалкенил, арил, гетероарил, арилокси, циано, азидо, галоген, гидроксил, нитро, карбоксил, тиол, тиоалкил, алкил, алкенил, алкинил, гетероциклил, аралкил, аминосульфониламино, сульфониламино, сульфониламино, оксо и т.п. Термин «незамещенный» означает, что указанная группа не содержит заместителей. Когда термин «замещенный» используется для описания структурной системы, подразумевается, что замещение происходит в любом положении в системе, где это допускает валентность. Когда группа или фрагмент содержит более одного заместителя, подразумевается, что заместители могут быть одинаковыми или отличными друг от друга. В некоторых вариантах осуществления замещенная группа или фрагмент содержит от одного до пяти заместителей. В некоторых вариантах осуществления замещенная группа или фрагмент содержит один заместитель. В некоторых вариантах осуществления замещенная группа или фрагмент содержит два заместителя. В некоторых вариантах осуществления замещенная группа или фрагмент содержит три заместителя. В некоторых вариантах осуществления замещенная группа или фрагмент содержит четыре заместителя. В некоторых вариантах осуществления замещенная группа или фрагмент содержит пять заместителей.

[0165] Под «необязательным» или «необязательно» подразумевается, что описываемое далее событие или обстоятельство может произойти, а может и не произойти, и что описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит, и случаи, в которых оно не происходит. Например, «необязательно замещенный алкил» включает как «алкил», так и «замещенный алкил», как определено в настоящей заявке. Что касается любой группы, содержащей один или несколько заместителей, специалистам в данной области техники будет понятно, что такие группы не предназначены для введения каких-либо замещений или схем замещения, которые являются стерически непрактичными, синтетически неосуществимыми и/или по своей природе нестабильными. Также будет понятно, что если группа или фрагмент необязательно замещены, описание включает как варианты осуществления, в которых группа или фрагмент замещены, так и варианты осуществления, в которых группа или фрагмент не замещены.

[0166] Термин “Q-tag”, используемый в настоящей заявке, относится к части полипептида, содержащей глутаминовый остаток, который, в результате трансклутаминаза-опосредованной реакции с соединением, содержащим амин  $-NH_2$ , обеспечивает конъюгат, содержащий часть полипептида, в которой глутаминовый остаток включает боковую цепь, модифицированную для включения амида, связанного с соединением. Q-tag известны из уровня техники. Неограничивающие примеры Q-tag представляют собой LLQGG (SEQ ID NO:172), GGGLLQGG (SEQ ID NO:173), RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQGFPP (SEQ ID NO:48), RPQGFPP (SEQ ID NO:49) и Q-tag,

раскрытые в Таблице 16 настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления Q-tag присоединен к С-концу тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления Q-tag присоединен к легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления Q-tag имеет природное происхождение. Например, мутация N297, приводящая к N297A, делает доступным Q295 антитела, где может происходить конъюгация (нумерация в соответствии с EU-индексом, *например*, как описано в Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) и Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication n° 91-3242, pp 662,680,689 (1991)). В некоторых вариантах осуществления Q-tag находится в Fc-домене антитела.

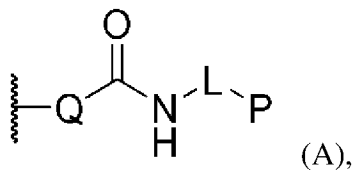
[0167] В данной заявке антитела и конъюгаты обозначаются в формате «TNT-у», где «у» представляет собой число (например, TNT-201) или комбинацию цифр и букв (например, «TNT-347xx»). Дефис предусмотрен просто для стиля и удобства чтения, а обозначения через дефис и без дефиса идентичны (например, «TNT-201» начает такую же конструкцию, что и «TNT201»). Каждое антитело или конъюгат может определяться множеством составляющих последовательностей (например, TNT-201 включает по меньшей мере последовательности для CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, VL, VH, тяжелой цепи и легкой цепи).

## **II. Конъюгаты**

[0168] Для улучшения специфичности нацеливания и распределения *in vivo* иммуномодулирующие олигонуклеотиды (*например*, CpG ODN) могут быть конъюгированы с антителом к нектину-4. Любое антитело к нектину-4 (т.е. любое антитело, которое специфически связывается с нектином-4) можно конъюгировать с иммуномодулирующими олигонуклеотидами, описанными в настоящей заявке. В частности, можно использовать антитела к нектину-4, описанные в разделе настоящего раскрытия, озаглавленном “Антитела к нектину-4”. Можно использовать любой иммуномодулирующий олигонуклеотид, описанный в настоящей заявке, в том числе описанные в разделе настоящего раскрытия, озаглавленном “Иммуномодулирующие олигонуклеотиды”. Антитела к нектину-4 можно конъюгировать с иммуномодулирующими олигонуклеотидами или другими агентами (также описанными в настоящей заявке) с использованием способов, описанных в настоящей заявке, или другими способами, известными из уровня техники, включая способы, описанные в US 2018/0312536 A1, содержание которого включено в настоящую заявку посредством ссылки для всех целей. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид конъюгата включает структуру любой из формул (C), (C'), (C''), (D), (D') или (D''), описанных в настоящем раскрытии. В некоторых вариантах осуществления CpG последовательность в иммуностимулирующем олигонуклеотиде является неметирированной.

[0169] В настоящей заявке представлены конъюгаты антител к нектину-4 (т.е. также указанные в настоящей заявке как антитела к нектину-4, конъюгированные с CpG

ODN; конъюгаты антител к нектину-4, конъюгаты антител против нектина-4 или просто “конъюгаты”), где CpG олигонуклеотид и антитело к нектину-4 связаны вместе через связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления одно антитело к нектину-4 может быть конъюгировано с одним или несколькими олигонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления конъюгат олигонуклеотид-антитело представляет собой конъюгат, включающий антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), включающими по меньшей мере один глутаминовый остаток, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A):



или его стереоизомер, смесь двух или более диастереомеров, таутомер или смесь двух или более таутомеров; или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат;

где:

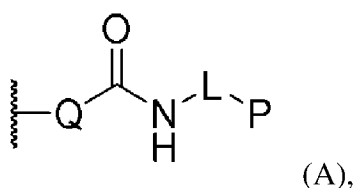
~~~~~ указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо представляет собой последовательность Q-tag пептида, включающую по меньшей мере один глутаминовый остаток;

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, связанную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид.


[0170] В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат, включающий антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело к нектину-4 или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), которые включают аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A),



или его стереоизомер, смесь двух или более диастереомеров, таутомер или смесь

двух или более таутомеров; или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат;

где:

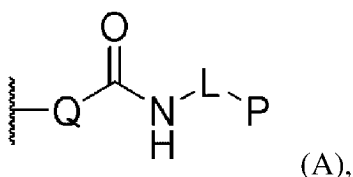
 указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо включает Q-tag пептид, включающ пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, связанную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и


каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид.

[0171] В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат, включающий антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело к нектину-4 или антигенсвязывающий фрагмент связан с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), которые включают аминокислотную последовательность RPQGF<sub>2</sub>GPP (SEQ ID NO:49), где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A),



или его стереоизомер, смесь двух или более диастереомеров, таутомер или смесь двух или более таутомеров; или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат;

где:

 указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

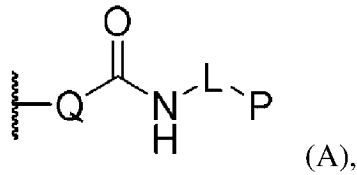
каждый Q независимо включает Q-tag пептид, включающий пептидную последовательность RPQGF<sub>2</sub>GPP (SEQ ID NO:49);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, связанную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид.

[0172] В других вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат, включающий антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), включающими по меньшей мере один глутаминовый остаток, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с

глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A),



или его стереоизомер, смесь двух или более диастереомеров, таутомер или смесь двух или более таутомеров; или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат;

где:

~~~~~ указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо представляет собой Q-tag пептид, включающий по меньшей мере один глутаминовый остаток;

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, связанную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов Таблицы 4.

[0173] В одном варианте осуществления конъюгат олигонуклеотид-антитело к нектину-4 имеет значение DAR от около 1 до около 20, от около 1 до около 10, от около 1 до около 8, от около 1 до около 4 или от около 1 до около 2. В другом варианте осуществления конъюгат олигонуклеотид-антитело к нектину-4 имеет значение DAR около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7 или около 8.

[0174] В некоторых вариантах осуществления конъюгат включает один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более, или двадцать или более Q-tag пептидов. В некоторых вариантах осуществления конъюгат включает один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или двадцать Q-tag пептидов. В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит 2 Q-tag пептида. В некоторых вариантах осуществления конъюгат включает один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более, или двадцать или более иммуномодулирующих олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления конъюгат включает один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, или двадцать иммуномодулирующих олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит один иммуномодулирующий олигонуклеотид. Иллюстративный конъюгат показан на Фиг. 9A-9D, который может включать любое антитело к нектину-4, описанное в настоящей заявке (включающее любую VH/VL, описанную в настоящей заявке и/или любую Fc-область, описанную в настоящей заявке), любой линкер, описанный в настоящей заявке, любой олигонуклеотид, описанный в настоящей заявке,

и/или любой Q-tag, описанный в настоящей заявке.

[0175] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты, представленные в настоящей заявке, также можно получить путем конъюгации антитела(антител) к нектину-4 и одного или нескольких агентов (таких как один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов) через поверхностные и/или открытые для взаимодействия аминокислотные остатки, такие как лизины и/или цистеины, на поверхности антитела и/или в подходящих химических условиях, известных из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления агент(агенты) (такой как один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов) и/или антитело(антитела) к нектину-4 модифицированы функциональной группой, способной к связыванию с функциональной группой, присутствующей на агенте (таком как иммуномодулирующий олигонуклеотид) или антителе, или аминокислотным остатком, открытым для взаимодействия или присутствующим на поверхности антитела к нектину-4. Например, в некоторых вариантах осуществления агент(агенты) (такой как один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов) может быть модифицирован функциональной группой, способной к взаимодействию с лизиновым остатком, например через механизм ацилирования, включающей, но не ограничиваясь этим, N-гидроксисукцинамидные эфиры, изо(тио)цианаты и бензоилгалогениды. В других вариантах осуществления агент(агенты) (такой как один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов) может быть модифицирован функциональной группой, способной к взаимодействию с цистеиновым остатком, например через образование дисульфидной связи, включающей, но не ограничиваясь этим, малеимиды, галогенацетамиды, 2-тиопиридины и 3-арилпропиолонитрилы.

#### II.A. ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

[0176] В одном аспекте олигонуклеотид в конъюгате антитело к нектину-4-олигонуклеотид представляет собой иммуномодулирующий (например, иммуностимулирующий) олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид включает 5-модифицированный уридин или 5-модифицированный цитидин. В некоторых вариантах осуществления включение 5-модифицированного уридина (например, 5-этинил-уридина) на 5'-конце иммуномодулирующего олигонуклеотида (например, из числа двух 5'-концевых нуклеозидов) усиливает иммуномодулирующие свойства олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид короче (например, включает в общей сложности от около 6 до около 16 нуклеотидов или от около 12 до около 14 нуклеотидов), чем типичный CpG ODN, который имеет длину 18-28 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления более короткий иммуномодулирующий олигонуклеотид (например, включающий в общей сложности от около 6 до около 16 нуклеотидов или от около 12 до около 14 нуклеотидов) сохраняет иммуномодулирующую активность более длинного типичного CpG ODN; или демонстрирует более высокую иммуномодулирующую активность (например, как

определено по активации NFκB или по изменениям уровней экспрессии маркеров клеточной поверхности активации или функции, таких как CD40, HLADR, CD69 или CD80, или по изменению уровней по меньшей мере одного цитокина (*например*, IL-6 или IL-10), по сравнению с более длинным CpG ODN. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид включает спейсер без азотистого основания. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид включает межнуклеозидный фосфотриэфир.

[0177] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид, представленный в настоящей заявке, демонстрирует стабильность (*например*, стабильность против нуклеаз), которая превосходит стабильность CpG ODN, содержащего в основном межнуклеозидный фосфат (*например*, более 50% межнуклеозидных фосфатов), без существенного ущерба для его иммуностимулирующей активности. Этот эффект может быть достигнут, *например*, путем включения по меньшей мере 50% (*например*, по меньшей мере 70%) межнуклеозидных фосфоротиоатов или фосфородитиоатов или путем включения межнуклеозидных фосфотриэфиров и/или межнуклеозидных спейсеров без азотистых оснований. Фосфотриэфиры и спейсеры без азотистых оснований также удобны для конъюгации с нацеливающим фрагментом. Фосфотриэфиры на основе фосфатов и спейсеры без азотистых оснований также можно использовать для снижения нецелевой активности по сравнению с олигонуклеотидами с полностью фосфоротиоатными остовами. Не желая ограничиваться теорией, этот эффект может быть достигнут за счет уменьшения самодоставки без нарушения опосредованной нацеливающим фрагментом доставки к клеткам-мишеням. Соответственно, олигонуклеотид по настоящему изобретению может включать около 15 или менее, около 14 или менее, около 13 или менее, около 12 или менее, около 11 или менее или около 10 или менее смежных межнуклеозидных фосфоротиоатов. *Например*, иммуностимулирующий олигонуклеотид, содержащий в общей сложности от около 12 до около 16 нуклеозидов, может содержать около 10 или менее смежных межнуклеозидных фосфоротиоатов.

[0178] Иммуностимулирующий олигонуклеотид, представленный в настоящей заявке, может содержать в общей сложности около 50 или менее, около 30 или менее, около 28 или менее, или около 16 или менее нуклеозидов. Иммуностимулирующий олигонуклеотид может содержать в общей сложности по меньшей мере 6, около 10 или более, или около 12 или более нуклеозидов. *Например*, иммуностимулирующий олигонуклеотид может содержать в общей сложности от около 6 до около 30, от около 6 до около 28, от около 6 до около 20, от около 6 до около 16, от около 10 до около 20, от около 10 до около 16, от около 12 до около 28, от около 12 до около 20 или от около 12 до около 16 нуклеозидов.

[0179] В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий олигонуклеотид включает один или несколько фосфотриэфиров (*например*, межнуклеозидных фосфотриэфиров) и/или фосфоротиоатов (*например*, от около 1 до

около 6 или от около 1 до около 4), *например*, на одном или обоих концах (*например*, в пределах шести 5'-концевых нуклеозидов или шести 3'-концевых нуклеозидов). Включение одного или нескольких межнуклеозидных фосфотриэфиров и/или фосфоротиоатов может повысить стабильность олигонуклеотида путем уменьшения скорости экзонуклеаза-опосредованной дегградации.

[0180] В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий олигонуклеотид включает фосфотриэфир или концевой фосфодифэфир, где фосфотриэфир или концевой фосфодифэфир включает линкер, связанный с нацеливающим фрагментом или конъюгирующей группой и, необязательно, с одной или несколькими (*например*, от около 1 до около 6) вспомогательными группами. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий олигонуклеотид включает только один линкер. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий олигонуклеотид включает только одну конъюгирующую группу.

[0181] Олигонуклеотид, представленный в настоящей заявке, может представлять собой гибридный олигонуклеотид, включая цепь и ее частичный или полный комплемент. Гибридные олигонуклеотиды могут иметь по меньшей мере 6 комплементарных спариваний оснований (*например*, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22 или около 23), вплоть до общего количества нуклеотидов, присутствующих во включенной более короткой цепи. Например, гибридная часть гибридного олигонуклеотида может содержать около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22 или около 23 пар оснований.

[0182] В одном аспекте олигонуклеотид в конъюгате олигонуклеотид-антитело к нектину-4 включает один или несколько сайтов CpG. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, или по меньшей мере 3 сайтов CpG. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид. В контексте настоящей заявки “модифицированный нуклеотид” представляет собой нуклеотид, отличный от рибонуклеотида (2'-гидроксинуклеотида). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами. В контексте настоящей заявки модифицированные нуклеотиды включают, но не ограничиваются этим, дезоксирибонуклеотиды, нуклеотидомиметики, нуклеотиды с удаленным азотистым основанием, 2'-модифицированные нуклеотиды, включающие связи 3' с 3' (инвертированные) нуклеотиды, нуклеотиды, включающие не встречающиеся в природе основания, связанные мостиковой связью нуклеотиды, пептидные нуклеиновые



кислоты (PNA), 2',3'-секо нуклеотидомиметики (аналоги незапертых нуклеоснований), запертые нуклеотиды, 3'-О-метокси (содержащие 2' межнуклеозидные связи) нуклеотиды, 2'-F-Арабинонуклеотиды, 5'-Me, 2'-фторнуклеотид, морфолинонуклеотиды, винилфосфонат-дезоксирибонуклеотиды, винилфосфонат-содержащие нуклеотиды и циклопропилфосфонат-содержащие нуклеотиды (сPrpN). 2'-модифицированные нуклеотиды (т.е. нуклеотид с группой, отличной от гидроксильной группы в 2'-положении пяти-членного сахарного кольца) включают, но не ограничиваются этим, 2'-О-алкилнуклеотиды, 2'-дезоксид-2'-галогеннуклеотиды, 2'-дезоксинуклеотиды, 2'-метоксиэтил (2'-О-2-метоксиэтил) нуклеотиды, 2'-аминонуклеотиды, 2'-аминоалкилнуклеотиды и 2'-алкилнуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 5-бром-2'-О-метилуридина, 5-бром-2'-дезоксисуридина, 2'-О-метилуридина, 2'-дезоксисуридина, 2'-О-метилтимидина, 2'-О-метилцитидина, 2'-О-(2-метоксиэтил)тимидина и 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина. Необязательно, чтобы все положения в данном соединении были одинаково модифицированы. Наоборот, более чем одна модификация может быть включена в один олигонуклеотид или даже в один его нуклеотид. Олигонуклеотиды можно синтезировать и/или модифицировать способами, известными в данной области техники. Модификация одного нуклеотида не зависит от модификации другого нуклеотида.

[0183] Модифицированные нуклеоснования включают синтетические и природные нуклеоснования, такие как 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6 замещенные пурины, (*например*, 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил или 5-пропинилцитозин), 5-метилцитозин (5-Me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-алкил (*например*, 6-метил, 6-этил, 6-изопропил или 6-н-бутил)-производные аденина и гуанина, 2-алкил (*например*, 2-метил-, 2-этил-, 2-изопропил- или 2-бутил-) и другие алкил-производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин, 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил (*например*, 5-бромуррацил и 5-иодурацил), цитозин, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 6-азоурацил, 6-азоцитозин, 6-азотимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-сульфгидрил-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил-, 8-оксо- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген- (*например*, 5-бром- и 5-иод-), 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин, 7-деазааденин, 3-деазагуанин и 3-деазааденин.

[0184] В некоторых вариантах осуществления один или несколько нуклеотидов олигонуклеотида связаны нестандартными связями или структурами (*например*, модифицированными межнуклеозидными связями или модифицированными структурами). В некоторых вариантах осуществления модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой не содержащую фосфат ковалентную межнуклеозидную связь. Модифицированные межнуклеозидные связи или структуры включают, но не ограничиваются этим, 5'-фосфоротиоатные группы, хиральные

фосфоротиоаты, тиофосфаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, алкилфосфонаты (например, метилфосфонаты или 3'-алкиленфосфонаты), хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты (например, 3'-аминофосфорамидаты, аминокилфосфорамидаты или тионофосфорамидаты), тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры, морфолино-связи, боранофосфаты с нормальными 3'-5'-связями, 2'-5'-связанные аналоги боранофосфатов или боранофосфаты, имеющие инвертированную полярность, где соседние пары нуклеозидных звеньев связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'. В некоторых вариантах осуществления в модифицированной межнуклеозидной связи или структуре отсутствует атом фосфора. Модифицированные межнуклеозидные связи, лишённые атома фосфора, включают, но не ограничиваются этим, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные межсахарные связи, смешанные гетероатомные и алкильные или циклоалкильные межсахарные связи или одну или несколько короткоцепочечных гетероатомных или гетероциклических межсахарных связей. В некоторых вариантах осуществления модифицированные межнуклеозидные структуры включают, но не ограничиваются этим, силоксановые структуры, сульфидные структуры, сульфоксидные структуры, сульфоновые структуры, формацетильные и тиоформацетильные структуры, метиленформацетильные и тиоформацетильные структуры, алкен-содержащие структуры, сульфаматные структуры, метиленимино и метиленигидразино структуры, сульфонатные и сульфонамидные структуры, амидные структуры и другие структуры, содержащие смешанные компоненты N, O, S и CH<sub>2</sub>.

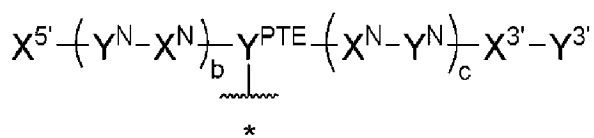
[0185] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14 или по меньшей мере 15 фосфоротиоатных связей. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14 или по меньшей мере 15 фосфородитиоатных связей. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 фосфоротиоатных связей. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 фосфородитиоатных связей. В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатные межнуклеозидные связи или фосфородитиоатные межнуклеозидные связи находятся между нуклеотидами в положениях 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 4-5, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19, 18-20 или 19-21 от 5'-конца олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает один или несколько модифицированных нуклеотидов и одну или несколько модифицированных межнуклеозидных связей.

[0186] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает концевой

кэп. В некоторых вариантах осуществления концевой кэп находится на 3'-конце олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления концевой кэп находится на 5'-конце олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления концевой кэп находится на 5'-конце и 3'-конце олигонуклеотида. Термин "концевой кэп", который также может быть указан как "кэп", имеет значение, общепринятое в данной области техники. Например, термин относится к фрагменту, который может представлять собой химически модифицированный нуклеотид или не нуклеотид, который может быть введен на одном или более концах одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты по изобретению. Эти концевые модификации могут защитить молекулу нуклеиновой кислоты от разрушения экзонуклеазой и могут способствовать доставке и/или локализации в клетке. В неограничивающих примерах кэп включает, но не ограничивается этим, полимер; лиганд; запертую нуклеиновую кислоту (LNA); глицерил; остаток рибозы без азотистого основания; инвертированный дезокси остаток без азотистого основания; инвертированный нуклеотид; 4',5'-метилнуклеотид; 1-(бета-D-эритрофуранозил) нуклеотид; 5'-меркапто группы; 4'-тионуклеотид; карбоциклический нуклеотид; 1,5-ангидрогекситолнуклеотид; L-нуклеотиды; альфа-нуклеотиды; нуклеотид с модифицированным основанием; фосфородитионатную связь; трео-пентофуранозилнуклеотид; ациклический 3',4'-секо-нуклеотид; ациклический 3,4-дигидроксипентил нуклеотид; ациклический 3,5-дигидроксипентилнуклеотид; 3'-3'-инвертированный нуклеотидный фрагмент; 3'-3'-инвертированный фрагмент без азотистого основания; 3'-2'-инвертированный нуклеотидный фрагмент; 3'-2'-инвертированный фрагмент без азотистого основания; 1,4-бутандиолфосфат; 3'-фосфорамидат; гексилфосфат; аминоксептилфосфат; 3'-фосфат; 3'-фосфоротиоат; 5'-5'-инвертированный нуклеотидный фрагмент; 5'-5'-инвертированный фрагмент без азотистого основания; 5'-фосфорамидат; 5'-фосфоротиоат; 1,4-бутандиолфосфат; 5'-амино; мостиковый и/или немостиковый 5'-фосфорамидат; фосфоротиоат и/или фосфородитиоат; или мостиковую или немостиковую метилфосфонатную группу. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает одну или несколько молекул концевых кэпов. В некоторых вариантах осуществления [N] представляет собой 3'-концевой кэп. В некоторых вариантах осуществления 3'-концевой кэп представляет собой O-(3-гидроксипропил)фосфоротиоат.

[0187] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину около 10-30, около 10-15, около 15-20, около 20-25, около 25-30, около 15-25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину около 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов.

[0188] В другом аспекте олигонуклеотид конъюгата включает:

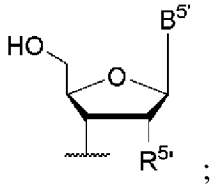


где

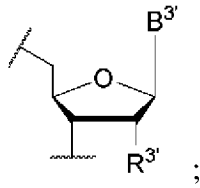
$b$  и  $c$  каждый независимо представляет собой целое число от 1 до 25; при условии, что сумма  $b$  и  $c$  равна по меньшей мере 5;

$\sim^*$  указывает точку присоединения иммуномодулирующего олигонуклеотида  $P$  к остальной части конъюгата;

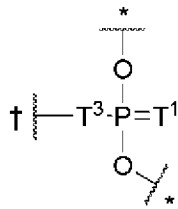
$X^{5'}$  представляет собой 5'-концевой нуклеозид, включающий структуру



$X^{3'}$  представляет собой 3'-концевой нуклеозид, включающий структуру

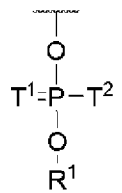


$Y^{PTE}$  представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир, включающий



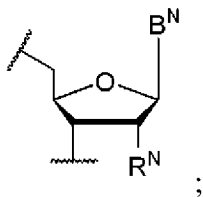
структуру  $\dagger$ , где  $*$  указывает точки присоединения к остальной части олигонуклеотида и  $\sim^{\dagger}$  указывает точку присоединения к линкеру  $L$ , или, если  $L$  отсутствует,  $\sim^{\dagger}$  указывает точку присоединения к Q-tag пептиду  $Q$  на глутаминовом остатке через амидную связь;

$Y^{3'}$  представляет собой концевой фосфотриэфир, включающий структуру

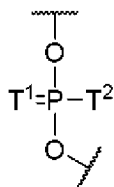


;

каждый  $X^N$  независимо представляет собой нуклеозид, включающий структуру



каждый  $Y^N$  независимо представляет собой межнуклеозидный линкер,



включающий структуру

где каждый  $V^N$  независимо представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеоснование;

каждый  $R^N$  независимо представляет собой -H или -O-C<sub>1-4</sub>-алкил, где C<sub>1-4</sub>-алкил из -O-C<sub>1-4</sub>-алкила необязательно дополнительно замещен -O-C<sub>1-4</sub>-алкилом;

$V^{5'}$  и  $V^{3'}$  независимо представляют собой модифицированное или немодифицированное нуклеоснование;

$R^{5'}$  и  $R^{3'}$  независимо представляют собой -H или -O-C<sub>1-4</sub>-алкил, где C<sub>1-4</sub>-алкил из -O-C<sub>1-4</sub>-алкила необязательно дополнительно замещен -O-C<sub>1-4</sub>-алкилом;

каждый  $T_1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T_2$  независимо представляет собой O<sup>-</sup> или S<sup>-</sup>; и

$T_3$  представляет собой группу, включающую олигоэтиленгликолевый фрагмент; и

$R^1$  представляет собой C<sub>1-4</sub>-алкилен-гидрокси.

[0189] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает нуклеотид с модифицированным нуклеоснованием. В некоторых вариантах осуществления  $V^{5'}$  представляет собой модифицированное нуклеоснование. В других вариантах осуществления  $V^{3'}$  представляет собой модифицированное нуклеоснование. В некоторых вариантах осуществления  $V^{5'}$  представляет собой немодифицированное нуклеоснование. В других вариантах осуществления  $V^{3'}$  представляет собой немодифицированное нуклеоснование. В некоторых других вариантах осуществления по меньшей мере один  $V^N$  представляет собой модифицированное нуклеоснование.

[0190] В некоторых вариантах осуществления **b** представляет собой целое число от около 1 до около 15. В некоторых вариантах осуществления **b** представляет собой целое число около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14 или около 15. В некоторых вариантах осуществления **b** представляет собой целое число около 3, около 4, около 11 или около 14. В некоторых вариантах осуществления **b** представляет собой целое число около 3. В некоторых вариантах осуществления **b** представляет собой целое число около 4. В некоторых вариантах осуществления **b** представляет собой целое число около 11. В некоторых вариантах осуществления **b** представляет собой целое число около 14.

[0191] В некоторых вариантах осуществления **c** представляет собой целое число от около 0 до около 10. В некоторых вариантах осуществления **c** представляет собой целое число около 0, около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9 или около 10. В некоторых вариантах осуществления **c** представляет собой целое число около 0 или около 8. В некоторых вариантах осуществления **c** представляет собой целое число около 0. В некоторых вариантах осуществления **c** представляет собой целое число

около 8.

[0192] В некоторых вариантах осуществления **b** представляет собой целое число около 3 и **c** представляет собой целое число около 8. В некоторых вариантах осуществления **b** представляет собой целое число около 4 и **c** представляет собой целое число около 8. В некоторых вариантах осуществления **b** представляет собой целое число около 11 и **c** представляет собой целое число около 0. В некоторых вариантах осуществления **b** представляет собой целое число около 14 и **c** представляет собой целое число около 0.

[0193] В некоторых вариантах осуществления **b** и **c** в сумме имеют значение от около 5 до около 20. В некоторых вариантах осуществления **b** и **c** в сумме имеют значение от около 5 до около 15. В некоторых вариантах осуществления **b** и **c** в сумме имеют значение около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14 или около 15. В некоторых вариантах осуществления **b** и **c** в сумме имеют значение около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13 или около 14. В некоторых вариантах осуществления **b** и **c** в сумме имеют значение около 11. В некоторых вариантах осуществления **b** и **c** в сумме имеют значение около 12. В некоторых вариантах осуществления **b** и **c** в сумме имеют значение около 14.

[0194] В некоторых вариантах осуществления каждый  $X^N$  независимо представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид или 2'-модифицированный рибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления каждый  $X^N$  независимо представляет собой 2'-дезоксиаденозин (A), 2'-дезоксигуанозин (G), 2'-дезоксцитидин (C), а 5-галоген-2'-дезоксцитидин, 2'-дезокситимидин (T), 2'-дезоксиуридин (U), 5-галоген-2'-дезоксиуридин, 2'-фторрибонуклеозид, 2'-метоксирибонуклеозид или 2'-(2-метоксиэтокси)рибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления каждый  $X^N$  независимо представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления каждый  $X^N$  независимо представляет собой 2'-дезоксиаденозин, 2'-дезоксигуанозин, 2'-дезоксцитидин, 5-галоген-2'-дезоксцитидин, 2'-дезокситимидин, 2'-дезоксиуридин или 5-галоген-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления каждый  $X^N$  независимо представляет собой 2'-дезоксиаденозин, 2'-дезоксигуанозин, 2'-дезоксцитидин, 2'-дезокситимидин, 5-бром-2'-дезоксиуридин или 5-иод-2'-дезоксиуридин.

[0195] В некоторых вариантах осуществления  $X^{3'}$  представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид или 2'-модифицированный рибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления  $X^{3'}$  представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления  $X^{3'}$  представляет собой 2'-дезоксиаденозин, 2'-дезоксигуанозин, 2'-дезоксцитидин, 5-галоген-2'-дезоксцитидин, 2'-дезокситимидин, 2'-дезоксиуридин, 5-галоген-2'-дезоксиуридин, 2'-фторрибонуклеозид, 2'-метоксирибонуклеозид или 2'-(2-метоксиэтокси)рибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления  $X^{3'}$  представляет собой 2'-дезоксиаденозин, 2'-дезоксигуанозин, 2'-дезоксцитидин, 5-галоген-2'-дезоксцитидин, 2'-дезокситимидин, 2'-дезоксиуридин или 5-галоген-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{3'}$  представляет собой 2'-дезокситимидин. В

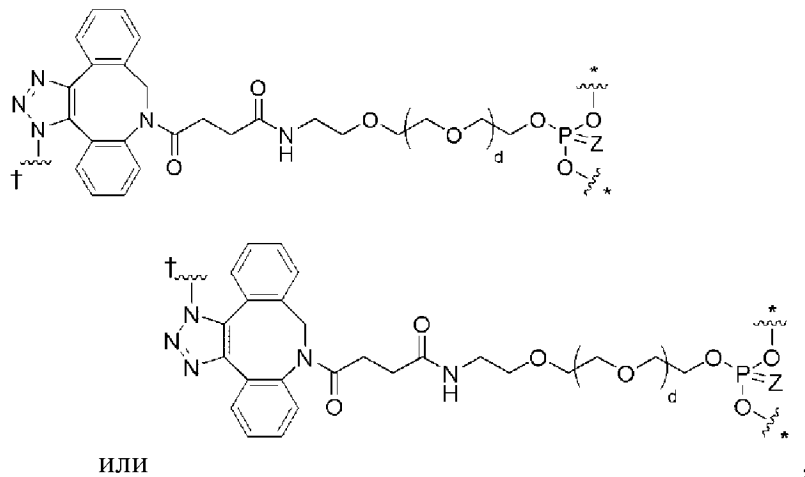
некоторых вариантах осуществления  $X^{3'}$  представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид с замещенным пиримидиновым основанием. В некоторых вариантах осуществления  $X^{3'}$  представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид с 5-замещенным пиримидиновым основанием. В некоторых вариантах осуществления  $X^{3'}$  представляет собой 2'-дезокситимидин, 5-галоген-2'-дезоксцитидин или 5-галоген-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{3'}$  представляет собой 2'-дезокситимидин, 5-бром-2'-дезоксцитидин, 5-иод-2'-дезоксцитидин, 5-бром-2'-дезоксиуридин или 5-иод-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{3'}$  представляет собой 2'-дезокситимидин, 5-бром-2'-дезоксиуридин или 5-иод-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{3'}$  представляет собой концевой нуклеотид, включающий 3' кэп-группу. В некоторых вариантах осуществления 3' кэп-группа представляет собой концевой фосфоэфир. В некоторых вариантах осуществления 3' кэп-группа представляет собой 3-гидроксил-пропилфосфорил (*m.e.* -P(O<sub>2</sub>)-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH).

[0196] В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид или 2'-модифицированный рибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 2'-дезоксаденозин, 2'-дезоксигуанозин, 2'-дезоксцитидин, 5-галоген-2'-дезоксцитидин, 2'-дезокситимидин, 2'-дезоксиуридин, 5-галоген-2'-дезоксиуридин, 2'-фторрибонуклеозид, 2'-метоксирибонуклеозид или 2'-(2-метоксиэтокси)рибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 2'-дезоксаденозин, 2'-дезоксигуанозин, 2'-дезоксцитидин, 5-галоген-2'-дезоксцитидин, 2'-дезокситимидин, 2'-дезоксиуридин или 5-галоген-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид с замещенным пиримидиновым основанием. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид с 5-замещенным пиримидиновым основанием. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 2'-дезокситимидин, 5-галоген-2'-дезоксцитидин или 5-галоген-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 5-галоген-2'-дезоксцитидин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 2'-дезоксиуридин, 5-галоген-2'-дезоксиуридин, 2'-метоксиуридин или 5-галоген-2'-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 5-галоген-2'-дезоксиуридин. В некоторых других вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 5-галоген-2'-метоксиуридин. В некоторых других вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 2'-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 2'-дезокситимидин, 5-бром-2'-дезоксцитидин, 5-иод-2'-дезоксцитидин, 5-бром-2'-дезоксиуридин или 5-иод-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 2'-дезокситимидин, 5-бром-2'-дезоксиуридин или 5-иод-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  представляет собой 5-бром-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$

представляет собой 5-йод-2'-дезоксигуанидин. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  содержит 3'-фосфоротиоатную группу. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  содержит 3'-фосфоротиоатную группу с хиральностью Rp. В некоторых вариантах осуществления  $X^{5'}$  содержит 3'-фосфоротиоатную группу с хиральностью Sp.

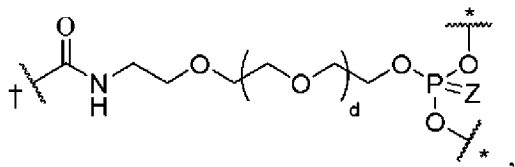
[0197] В некоторых вариантах осуществления  $Y^{PTE}$  представляет собой межнуклеозидный фосфотиотриэфир.

[0198] В некоторых вариантах осуществления  $Y^{PTE}$  представляет собой



где Z представляет собой O или S; d представляет собой целое число от около 0 до около 50; два  $\sim^*$  на правой стороне структуры указывают точки присоединения к олигонуклеотиду P; и  $\sim^+$  на левой стороне структуры указывает точку присоединения к остальной части конъюгата. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой O. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой S. В некоторых вариантах осуществления d представляет собой целое число от около 0 до около 10. В некоторых вариантах осуществления d представляет собой целое число от около 0 до около 5. В некоторых вариантах осуществления d представляет собой целое число около 0, около 1, около 2, около 3, около 4 или около 5. В некоторых вариантах осуществления d представляет собой целое число около 0, около 1 или около 3.

[0199] В некоторых вариантах осуществления  $Y^{PTE}$  представляет собой



где Z представляет собой O или S; d представляет собой целое число от около 0 до около 50; два  $\sim^*$  на правой стороне структуры указывают точки присоединения к олигонуклеотиду P; и  $\sim^+$  на левой стороне структуры указывает точку присоединения к остальной части конъюгата. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой O. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой S. В некоторых



вариантах осуществления  $d$  представляет собой целое число от около 0 до около 10. В некоторых вариантах осуществления  $d$  представляет собой целое число от около 0 до около 5. В некоторых вариантах осуществления  $d$  представляет собой целое число около 0, около 1, около 2, около 3, около 4 или около 5. В некоторых вариантах осуществления  $d$  представляет собой целое число около 0, около 1 или около 3.

[0200] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает один дополнительный межнуклеозидный фосфотриэфир. В одном варианте осуществления дополнительный межнуклеозидный фосфотриэфир представляет собой  $C_{1-6}$  алкилфосфотриэфир. В другом варианте осуществления дополнительный межнуклеозидный фосфотриэфир представляет собой этилфосфотриэфир.

[0201] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает один 5-галоген-2'-дезоксисуридин. В одном варианте осуществления 5-галоген-2'-дезоксисуридин представляет собой 5-фтор-2'-дезоксисуридин, 5-бром-2'-дезоксисуридин или 5-иод-2'-дезоксисуридин. В другом варианте осуществления 5-галоген-2'-дезоксисуридин представляет собой 5-бром-2'-дезоксисуридин или 5-иод-2'-дезоксисуридин. В еще одном варианте осуществления 5-галоген-2'-дезоксисуридин представляет собой 5-фтор-2'-дезоксисуридин. В еще одном варианте осуществления 5-галоген-2'-дезоксисуридин представляет собой 5-бром-2'-дезоксисуридин. И еще в одном варианте осуществления 5-галоген-2'-дезоксисуридин представляет собой 5-иод-2'-дезоксисуридин.

[0202] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает три или более 2'-дезоксцитидинов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает три 2'-дезоксцитидина.

[0203] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает четыре или более 2'-дезоксигуанозинов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает четыре 2'-дезоксигуанозина.

[0204] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает три 2'-дезоксцитидина и четыре 2'-дезоксигуанозина. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает один, два или три CG динуклеотида. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает три CG динуклеотида.

[0205] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает три или более 2'-дезокситимидинов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает три, четыре, пять, шесть, семь или восемь 2'-дезокситимидинов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает три, четыре, пять или восемь 2'-дезокситимидинов.

[0206] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид не включает 2'-дезоксиаденозин. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает один или два 2'-дезоксиаденозина.

[0207] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину от около 5 до около 20 или от около 6 до около 15. В некоторых вариантах осуществления

олигонуклеотид имеет длину около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14 или около 15. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину около 10, около 11, около 12, около 13, около 14 или около 15.

[0200] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает один или несколько межнуклеозидных фосфоротиоатов. В некоторых вариантах осуществления все межнуклеозидные фосфоэфиры в олигонуклеотиде представляют собой межнуклеозидные фосфоротиоаты. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает один или несколько хиральных межнуклеозидных фосфоротиоатов.

[0209] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, включающие последовательность  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174), или их стереоизомеры, смеси двух или более диастереомеров, таутомеры или смеси двух или более таутомеров; или их фармацевтически приемлемые соли, сольваты или гидраты являются такими, как описано, например, в WO2018/189382 A1.

[0210] В одном варианте осуществления олигонуклеотид включает последовательность  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174), или его стереоизомер, смесь двух или более диастереомеров, таутомер или смесь двух или более таутомеров; или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат; где:

x представляет собой целое число от около 1 до около 4;

$N^1$  отсутствует или представляет собой 2'-дезокситимидин;

$N^2$  представляет собой 2'-деоксирибонуклеотид с модифицированным нуклеоснованием;

$N^3$  представляет собой 2'-деоксиаденозин или 2'-дезокситимидин, каждый из которых необязательно включает 3'-фосфотриэфир;

$N^4$  представляет собой 2'-деоксиаденозин или 2'-дезокситимидин;

$N^5$  представляет собой 2'-дезокситимидин необязательно, включающий 3'-фосфотриэфир; и

C представляет собой 2'-деоксицитидин и G представляет собой 2'-дезоксигуанозин.

[0211] В некоторых вариантах осуществления в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174), x представляет собой целое число около 1, около 2, около 3 или около 4. В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174), x представляет собой целое число около 1. В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174), x представляет собой целое число около 4.

[0212] В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174),  $N^1$  отсутствует. В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174),  $N^1$  представляет собой 2'-дезокситимидин.

[0213] В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174),  $N^2$  представляет собой 2'-деоксирибонуклеотид с замещенным пиримидиновым основанием. В некоторых вариантах осуществления, в

$N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174),  $N^2$  представляет собой 2'-дезоксирибонуклеотид с 5-замещенным пиримидиновым основанием. В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174),  $N^2$  представляет собой 5-галоген-2'-дезоксцитидин или 5-галоген-2'-дезоксуридин. В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174),  $N^2$  представляет собой 5-бром-2'-дезоксуридин или 5-иод-2'-дезоксуридин.

[0214] В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174),  $N^3$  представляет собой 2'-дезоксаденозин, включающий 3'-фосфотриэфир. В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174),  $N^3$  представляет собой 2'-дезокситимидин. В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174),  $N^3$  представляет собой 2'-дезокситимидин, включающий 3'-фосфотриэфир.

[0215] В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174),  $N^4$  представляет собой 2'-дезоксаденозин. В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174),  $N^4$  представляет собой 2'-дезокситимидин.

[0216] В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174),  $N^5$  представляет собой 2'-дезокситимидин. В некоторых вариантах осуществления, в  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174),  $N^5$  представляет собой 2'-дезокситимидин, включающий 3'-фосфотриэфир.

[0217] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174) включает один или несколько межнуклеозидных фосфоротиоатов или фосфородитиоатов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174) включает по меньшей мере один хиральный межнуклеозидный фосфоротиоат или фосфородитиоат. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174) включает по меньшей мере один хиральный фосфородитиоат. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид  $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$  (SEQ ID NO:174) представляет собой олигонуклеотидную последовательность, описанную, например, в WO2018/189382 A1.

[0218] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой иммуностимулирующий олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящей заявке, функционирует как PAMS. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящей заявке, активирует врожденный иммунный ответ или стимулирует адаптивный иммунный ответ, запуская передачу сигналов TLR9. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящей заявке, является агонистом TLR9.

[0219] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой CpG олигонуклеотид, включающий модификацию, включающую 5-галогенуридин или 5-алкинилуридин, или его усеченный вариант (например, соединения, включающие в общей

сложности от около 6 до около 16 нуклеозидов). В некоторых вариантах осуществления усеченный олигонуклеотид, представленный в настоящей заявке, включает усеченную олигонуклеотидную последовательность, из которой один или несколько 3'-концевых нуклеотидов удалены, или один или несколько из нуклеотидов внутри последовательности вырезаны).

[0220] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере одну иммуностимулирующую последовательность (ISS). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящей заявке, включает около 1, около 2, около 3 или около 4 ISS. ISS в иммуностимулирующих олигонуклеотидах зависит от целевого организма. Общей характерной особенностью ISS, используемых в олигонуклеотидах, представленных в настоящей заявке, является цитидин-р-гуанозин последовательность, в которой р представляет собой межнуклеозидный фосфодиэфир (например, фосфат или фосфоротиоат) или межнуклеозидный фосфотриэфир. В некоторых вариантах осуществления цитидин и гуанозин в ISS, каждый независимо, включает 2'-дезоксирибозу. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящей заявке, включает около 1, около 2 или около 3 человеческих ISS. В некоторых вариантах осуществления человеческая ISS представляет собой CG или NCG, где N представляет собой уридин, цитидин или тимидин, или модифицированный уридин или цитидин; и G представляет собой гуанозин или модифицированный гуанозин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин или цитидин представляет собой 5-галогенуридин (например, 5-иодуридин или 5-бромурин), 5-алкинилуридин (например, 5-этинилуридин или 5-пропинилуридин), 5-гетероарилуридин или 5-галогенцитидин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный гуанозин представляет собой 7-деазагуанозин. В некоторых вариантах осуществления человеческая ISS представляет собой NCG, в одном варианте осуществления N представляет собой 5-галогенуридин. В некоторых вариантах осуществления человеческая ISS представляет собой UCG, в одном варианте осуществления U представляет собой 5-алкинилуридин, а в другом варианте осуществления U представляет собой 5-этинилуридин. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящей заявке, предназначенный для человека, включает ISS в пределах четырех смежных нуклеотидов, которые включают 5'-концевой нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящей заявке, предназначенный для человека, включает 5'-концевую ISS. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящей заявке, включает мышиную ISS. В некоторых вариантах осуществления мышинная ISS представляет собой гексамерную нуклеотидную последовательность: Pu-Pu-CG-Py-Py (SEQ ID NO:498), где каждый Pu независимо представляет собой пуриновый нуклеотид, и каждый Py независимо представляет собой пиримидиновый нуклеотид.

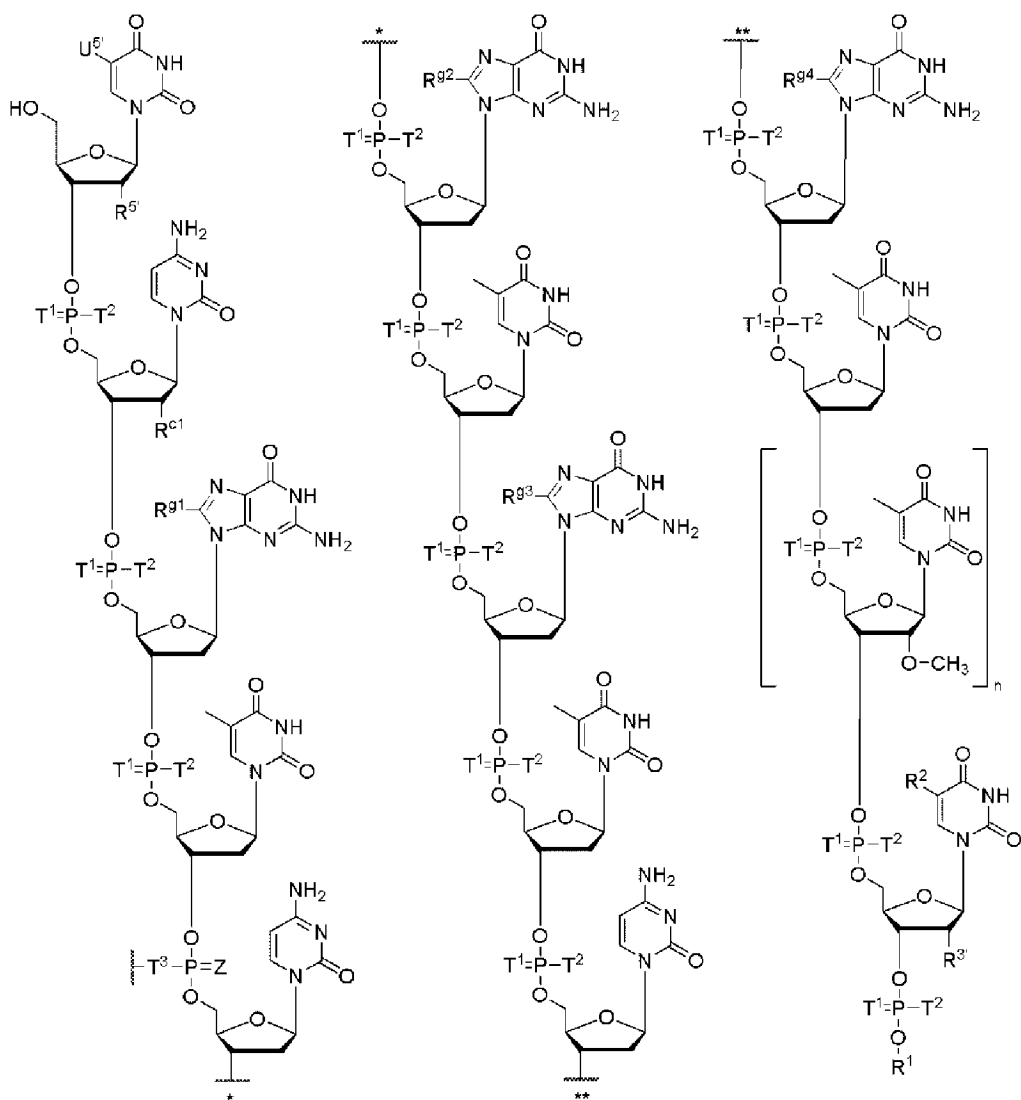
[0221] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующие нуклеотиды относительно CpG в олигонуклеотиде, представленном в настоящей заявке, не содержат

2'-алкоксирибозы. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующие нуклеотиды относительно CpG в олигонуклеотиде, представленном в настоящей заявке, включают только 2'-дезоксирибозы в качестве сахаров.

[0222] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет (1) высокое содержание фосфоротиоатов или фосфородитиоатов (например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80% нуклеозидов могут быть связаны фосфоротиоатами или фосфородитиоатами); (2) отсутствие поли-G хвостов; (3) нуклеозиды в олигонуклеотиде включают 2'-дезоксирибозы или 2'-модифицированные рибозы (*например*, 2'-галоген (*например*, 2'-фтор, 2'-бром или 2'-йод) или необязательно замещенный 2'-алкокси (*например*, 2'-метокси)); и/или (4) включение 5'-концевой ISS, которая представляет собой NCG, где N представляет собой уридин, цитидин или тимидин, или модифицированный уридин или цитидин, и G представляет собой гуанозин или модифицированный гуанозин.

[0223] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид подавляет адаптивный иммунный ответ путем уменьшения активации передачи сигналов TLR9 (*например*, посредством антагонизма TLR9). В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный олигонуклеотид, представленный в настоящей заявке, включает по меньшей мере два 2'-алкоксинуклеотида, которые являются 5'-фланкирующими относительно CpG, как описано формулой N<sup>1</sup>-N<sup>2</sup>-CG, где N<sup>1</sup> и N<sup>2</sup> каждый независимо представляет собой нуклеотид, содержащий 2'-алкоксирибозу (*например*, 2'-метоксирибозу). В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивные олигонуклеотиды являются метилированными.

[0224] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает структуру:

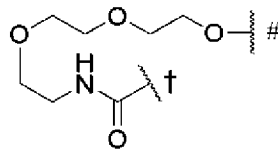


где

$\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый T<sup>1</sup> независимо представляет собой O или S;

каждый T<sup>2</sup> представляет собой O<sup>-</sup> или S<sup>-</sup>;



T<sup>3</sup> представляет собой группу  $\text{---} \text{N}(\text{H})\text{---C}(=\text{O})\text{---}$ , где  $\sim^\dagger$  указывает точку присоединения к L и где  $\sim^\#$  указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

U<sup>5</sup> представляет собой -H или галоген;

R<sup>5</sup> представляет собой -H или метокси;

R<sup>c1</sup> представляет собой -H или метокси;

R<sup>g1</sup>, R<sup>g2</sup>, R<sup>g3</sup> и R<sup>g4</sup> представляют собой H или оксо, при этом, когда один из R<sup>g1</sup>, R<sup>g2</sup>,

$R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляет собой оксо, тогда углерод, к которому оксо присоединен, содержит простую связь с азотом кольца в 7-положении;

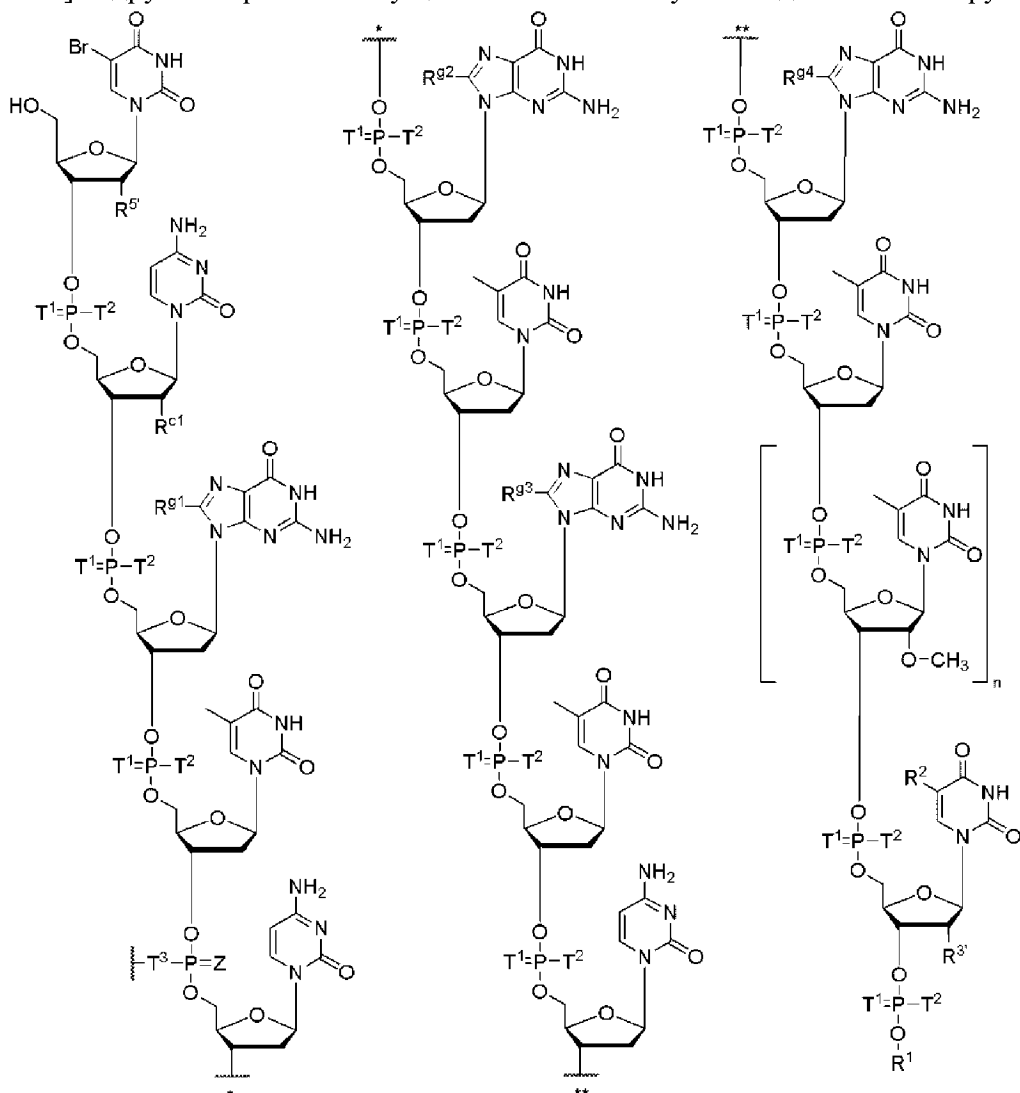
$R^{3'}$  представляет собой метокси;

$R^1$  представляет собой  $C_{1-4}$ -алкилен-гидрокси;

$R^2$  представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

[0225] В других вариантах осуществления олигонуклеотид включает структуру:

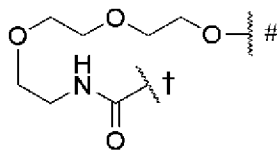


где

$\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T^2$  представляет собой O<sup>-</sup> или S<sup>-</sup>;



$T^3$  представляет собой группу

, где  $\sim^+$  указывает точку

присоединения к L и где  $\sim^\#$  указывает точку присоединения к остальной части

олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой H или оксо, при этом, когда один из  $R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляет собой оксо, тогда углерод, к которому оксо присоединен, содержит простую связь с азотом кольца в 7-положении;

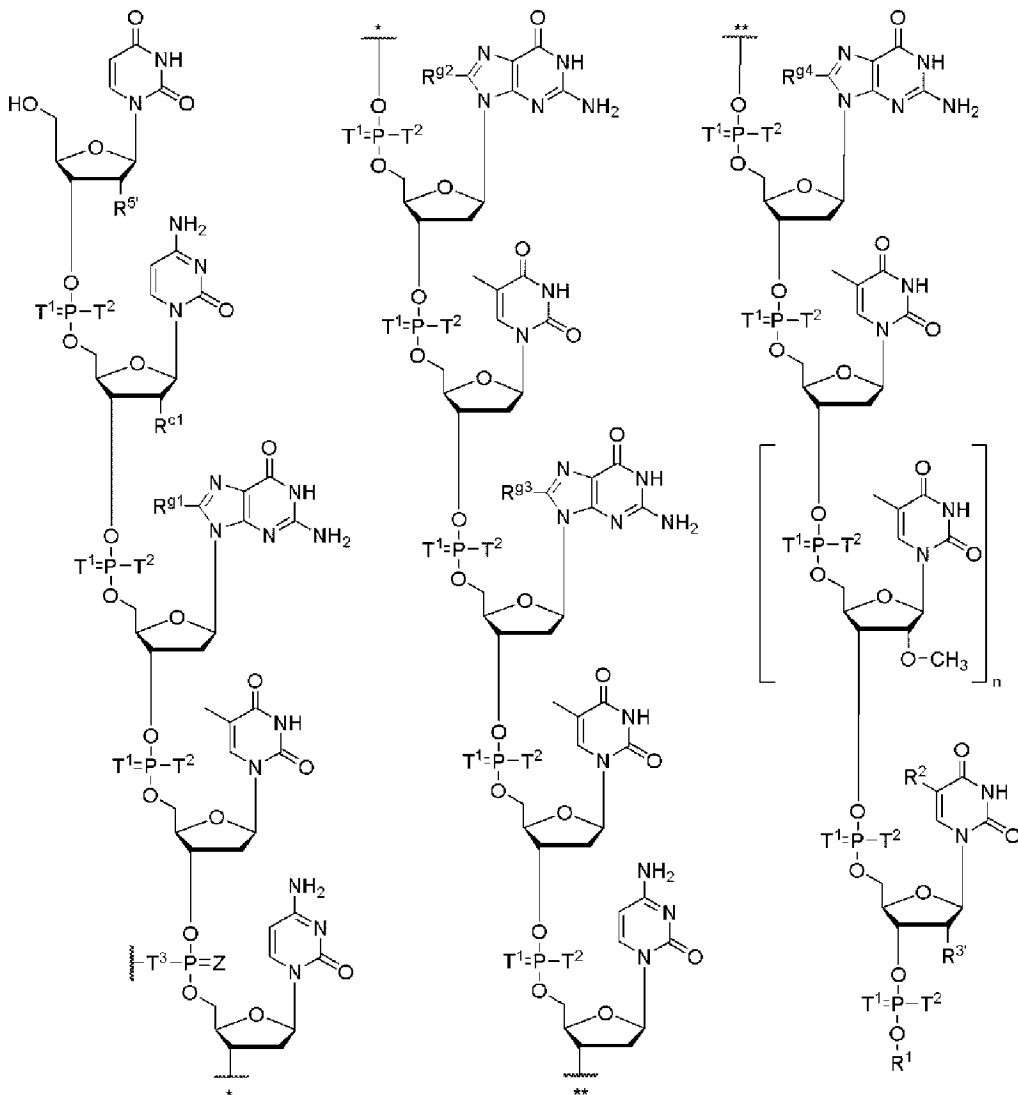
$R^{3'}$  представляет собой метокси;

$R^1$  представляет собой  $C_{1-4}$ -алкилен-гидрокси;

$R^2$  представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

[0226] В других вариантах осуществления олигонуклеотид включает структуру:



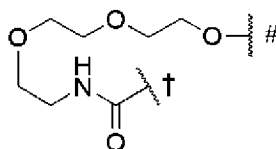
где

~~~~ \* и ~~~~ \*\* указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;



каждый  $T^2$  представляет собой  $O^-$  или  $S^-$ ;



$T^3$  представляет собой группу , где указывает точку присоединения к L и где указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой H или оксо, при этом, когда один из  $R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$ , и  $R^{g4}$  представляет собой оксо, тогда углерод, к которому оксо присоединен, содержит простую связь с азотом кольца в 7-положении;

$R^{3'}$  представляет собой метокси;

$R^1$  представляет собой  $C_{1-4}$ -алкилен-гидрокси;

$R^2$  представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

[0227] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает одну или несколько немодифицированных последовательностей, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеосооснованиями от последовательностей, показанных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает одну или несколько из модифицированных последовательностей, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеосооснованиями от последовательностей, показанных в Таблице 2.

**Таблица 1**

**Немодифицированные олигонуклеотиды**

| SEQ ID NO. | Последовательность немодифицированного олигонуклеотида<br>(5' → 3') |
|------------|---|
| <b>1</b>   | tucgtcgtgacgtt  |
| <b>2</b>   | ucgtcgtgacgtt   |
| <b>129</b> | tcgtcgttttgcgttttgcgtt  |

**Таблица 2**

**Модифицированные олигонуклеотиды**

| SEQ ID NO. | Последовательность модифицированного олигонуклеотида<br>(5' → 3') | Соед. № |
|------------|---|---------|
| <b>3</b>   | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgsts <b>T</b> -c3                     | 1.1b    |
| <b>4</b>   | <u>u</u> scsg <b>g</b> stscsgstsgstscsgst <b>t</b> -c3            | 2.1b    |

|    |  |       |
|----|--|-------|
| 5  | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgstst-c3     | 2.2b  |
| 6  | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgstst-c3     | 2.3b  |
| 7  | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgstst-c3     | 2.4b  |
| 8  | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgstst-c3     | 3.1b  |
| 9  | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgstst-c3     | 3.2b  |
| 10 | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgststst-c3   | 3.3b  |
| 11 | uscsgstscsgstsgstscsgstst-c3             | 4.1b  |
| 12 | uscsgstscsgstsgstscsgststst-c3           | 4.2b  |
| 13 | uscsgstscsgstsgstscsgststst-c3           | 4.3b  |
| 14 | <u>u</u> scs2gstscsgstsgstscsgstst-c3    | 5.1a  |
| 15 | <u>u</u> scsgs2tscsgstsgstscsgstst-c3    | 5.2a  |
| 16 | <u>u</u> scsgstscs2gstsgstscsgstst-c3    | 5.3a  |
| 17 | <u>u</u> scsgstscsgs2tsgstscsgstst-c3    | 5.4a  |
| 18 | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgstst-c3     | 5.5a  |
| 19 | <u>u</u> scsgstscsgstsgs2tscsgstst-c3    | 5.6a  |
| 20 | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgstst-c3     | 5.7a  |
| 21 | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscs2gstst-c3    | 5.8a  |
| 22 | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgs2tst-c3    | 5.9a  |
| 23 | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgstst-c3     | 5.10a |
| 24 | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgstst-c3     | 5.11a |
| 25 | <u>u</u> scs2gstscsgstsgstscsgstst-c3    | 5.12a |
| 26 | uscsgs2tscsgstsgstscsgststst-c3          | 6.1b  |
| 27 | uscsgstscsgstsgstscsgststst-c3           | 6.2b  |
| 28 | uscsgs2tscsgstsgstscsgststst-c3          | 6.3b  |
| 29 | <u>u</u> scs2gstscsgstsgstscsgststst-c3  | 7.1b  |
| 30 | <u>u</u> scsgstscsgstsgs2tscsgststst-c3  | 7.2b  |
| 31 | <u>u</u> scs2gstscsgstsgs2tscsgststst-c3 | 7.3b  |
| 32 | <u>u</u> scsgstscs2gstsgstscsgststst-c3  | 7.4b  |
| 33 | <u>u</u> scsgstscsgs2tsgstscsgststst-c3  | 7.5b  |
| 34 | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgststst-c3   | 7.6b  |
| 35 | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscsgststst-c3   | 7.7b  |
| 36 | <u>u</u> scs2gstscsgstsgstscsgststst-c3  | 7.8b  |
| 37 | <u>u</u> scsgs2tscsgstsgstscsgststst-c3  | 7.9b  |
| 38 | <u>u</u> scsgstscsgstsgstscs2gststst-c3  | 7.10b |

|     |  |        |
|-----|--|--------|
| 130 | uscsgstscsgstsgstscsgsts <b>T</b> -c3                        | 8.1b   |
| 131 | uscsgstscsgstsgstscsgst <b>s</b> t-c3                        | 9.1b   |
| 132 | uscsgstscsgstsgstscsgst <b>g</b> t-c3                        | 9.2b   |
| 133 | uscsgstscsgstsgstscsgst <b>g</b> st-c3                       | 9.3b   |
| 134 | uscsgstscsgstsgstscsgst <b>s</b> t-c3                        | 9.4b   |
| 135 | uscsgstscsgstsgstscsgst <b>s</b> t-c3                        | 10.1b  |
| 136 | uscsgstscsgstsgstscsgst <b>st</b> -c3                        | 10.2b  |
| 137 | uscsgstscsgstsgstscsgst <b>stst</b> -c3                      | 10.3b  |
| 138 | <u>uscsgstscsgstsgstscsgst</u> <b>s</b> t-c3                 | 12.1b  |
| 139 | <u>uscsgstscsgstsgstscsgst</u> <b>st</b> -c3                 | 12.2b  |
| 140 | <u>uscsgstscsgstsgstscsgst</u> <b>st</b> -c3                 | 12.3b  |
| 141 | usc <b>2</b> gstscsgstsgstscsgst <b>s</b> t-c3               | 13.1a  |
| 142 | uscsg <b>2</b> tscsgstsgstscsgst <b>s</b> t-c3               | 13.2a  |
| 143 | uscsgstsc <b>2</b> gstsgstscsgst <b>s</b> t-c3               | 13.3a  |
| 144 | uscsgstscsg <b>2</b> tsgstscsgst <b>s</b> t-c3               | 13.4a  |
| 145 | uscsgstscsgst <b>2</b> gstscsgst <b>s</b> t-c3               | 13.5a  |
| 146 | uscsgstscsgstsg <b>2</b> tscsgst <b>s</b> t-c3               | 13.6a  |
| 147 | uscsgstscsgstsgst <b>2</b> csgst <b>s</b> t-c3               | 13.7a  |
| 148 | uscsgstscsgstsgstsc <b>2</b> gst <b>s</b> t-c3               | 13.8a  |
| 149 | uscsgstscsgstsgstscsg <b>2</b> st-c3                         | 13.9a  |
| 150 | uscsgstscsgstsgstscsgst <b>2</b> t-c3                        | 13.10a |
| 151 | uscsgstscsgstsgstscsgst <b>us</b> 2-c3                       | 13.11a |
| 152 | usc <b>2</b> gstscsgstsgstscsgst <b>us</b> 2-c3              | 13.12a |
| 153 | <u>uscsgs2tscsgstsgstscsgst</u> <b>st</b> -c3                | 14.1b  |
| 154 | <u>uscsgstscsgstsgstscsgst</u> <b>2</b> csgst <b>st</b> -c3  | 14.2b  |
| 155 | <u>uscsgs2tscsgstsgstscsgst</u> <b>2</b> csgst <b>st</b> -c3 | 14.3b  |
| 156 | usc <b>2</b> gstscsgstsgstscsgst <b>st</b> -c3               | 15.1b  |
| 157 | uscsgstscsgstsg <b>2</b> tscsgst <b>st</b> -c3               | 15.2b  |
| 158 | usc <b>2</b> gstscsgstsg <b>2</b> tscsgst <b>st</b> -c3      | 15.3b  |
| 159 | uscsgstsc <b>2</b> gstsgstscsgst <b>st</b> -c3               | 15.4b  |
| 160 | uscsgstscsg <b>2</b> tsgstscsgst <b>st</b> -c3               | 15.5b  |
| 161 | uscsgstscsgst <b>2</b> gstscsgst <b>st</b> -c3               | 15.6b  |
| 162 | uscsgstscsgstsg <b>2</b> csgst <b>st</b> -c3                 | 15.7a  |
| 163 | uscsgstscsgstsgst <b>2</b> csgst <b>st</b> -c3               | 15.7b  |

|            |                                |        |
|------------|--------------------------------|--------|
| <b>164</b> | uscstgscsgstgsgstscsgstst-c3   | 15.8b  |
| <b>165</b> | uscsgs2tscsgstgsgstscsgstst-c3 | 15.9b  |
| <b>166</b> | uscsgstscsgstgsgstscs2gstst-c3 | 15.10b |

\* **u**: 5-бром-2'-дезоксиуридин

**g**: 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозин

**u**: 5-бром 2'-ОМе уридин

**c**: 2'-ОМе- Цитидин

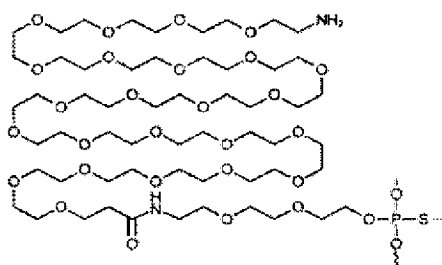
**t**: 2'-ОМе- Тимидин

**u**: 2'-ОМе- Уридин

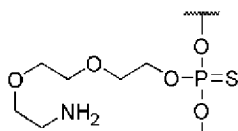
**u**: 2'-дезоксиуридин

**T**: 2'-ОМОЕ тимидин

**ts**: фосфотриэфирный линкер-PEG<sub>24</sub>-NH<sub>2</sub>



после тимидина;

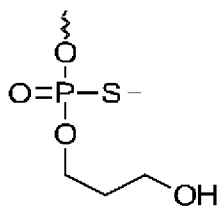


**ts**: фосфотриэфирный линкер после тимидина;

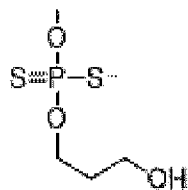
строчные буквы: 2'-дезокси нуклеотид

s: фосфоротиоатная связь

s2: фосфородитиоатная связь



c3:

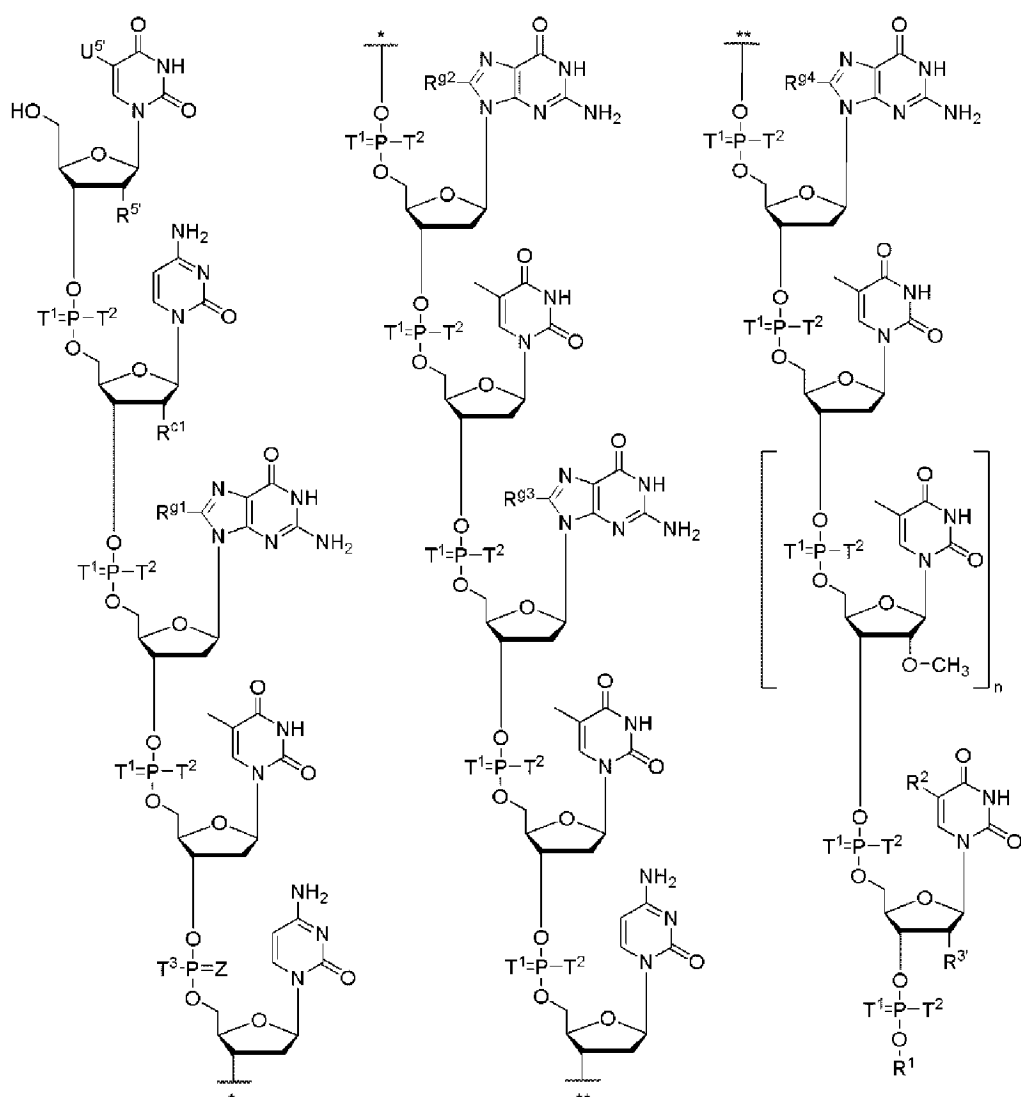


s2-c3:

[0228] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид функционализован химической меткой для присоединения к связывающему фрагменту. В некоторых

вариантах осуществления химическая метка присоединена к межнуклеозидной связи олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления химическая метка присоединена к 5' межнуклеозидной связи. В некоторых вариантах осуществления химическая метка присоединена к 3' межнуклеозидной связи. В некоторых вариантах осуществления межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления межнуклеозидная связь представляет собой фосфородитиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления химическая метка расположена ближе к 5'-концу, чем к 3'-концу олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления химическая метка присоединена к нуклеобазе.

[0229] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид включает структуру формулы (C),



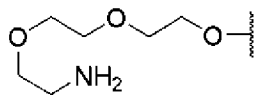
(C),

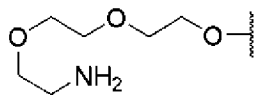

где

$\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T^2$  представляет собой  $S^-$ ;



$T^3$  представляет собой группу , где  указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

$Z$  представляет собой  $O$  или  $S$ ;

$U^{5'}$  представляет собой  $-H$  или галоген;

$R^{5'}$  представляет собой  $-H$  или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой  $-H$  или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой  $H$  или оксо, при этом обязательно по меньшей мере один из  $R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляет собой оксо, и при этом, когда один из  $R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляет собой оксо, тогда углерод, к которому оксо присоединен, содержит простую связь с азотом кольца в 7-положении;

$R^{3'}$  представляет собой метокси или 2-метоксиэтокси;

$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

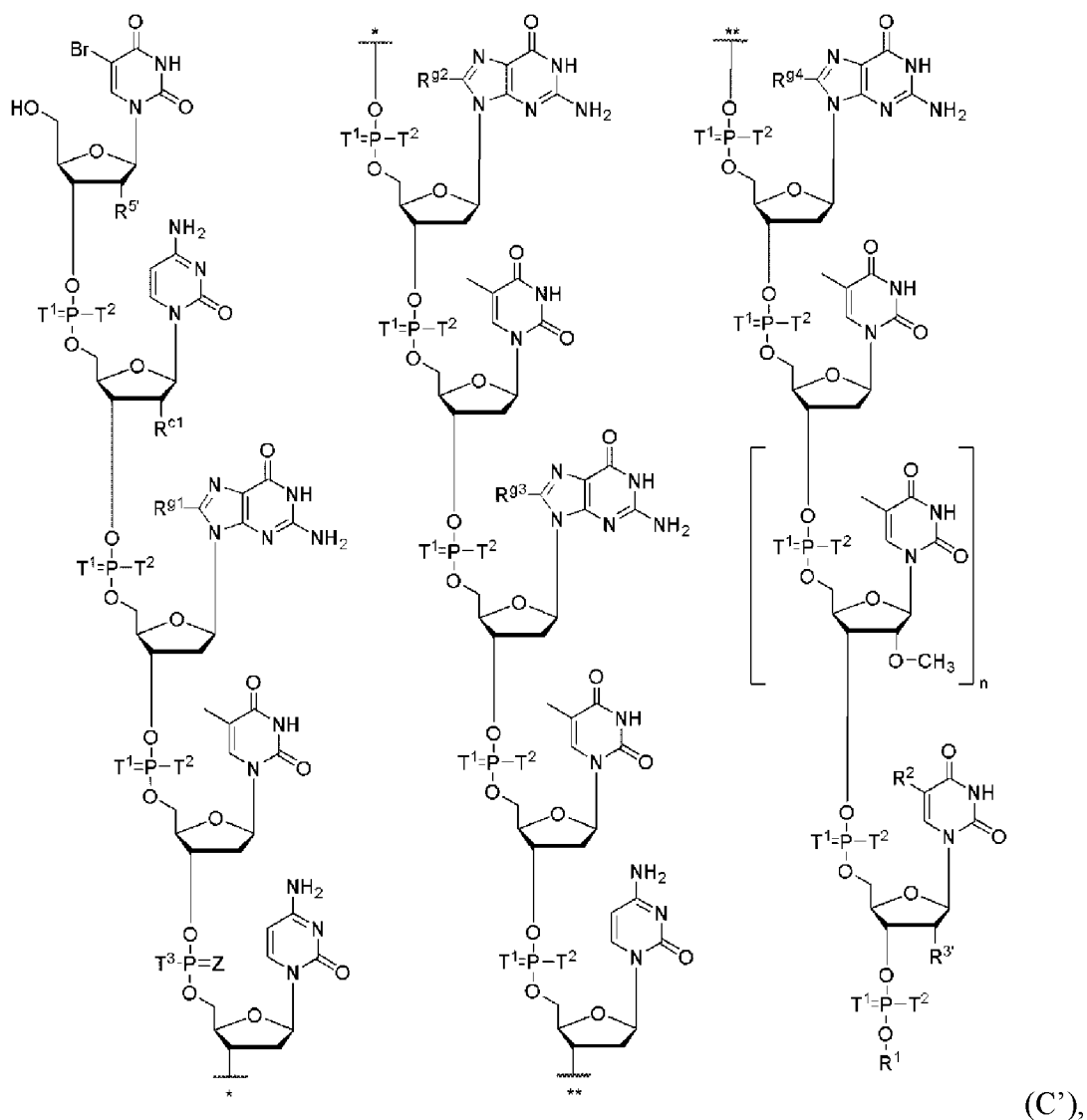
$R^2$  представляет собой  $-H$  или метил; и

$n$  представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

[0230] В некоторых вариантах осуществления данного аспекта  $U^{5'}$  представляет собой  $-H$ . В других вариантах осуществления  $U^{5'}$  представляет собой галоген. В некоторых вариантах осуществления  $U^{5'}$  представляет собой иод или бром. В некоторых вариантах осуществления данного аспекта иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C) представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C'). В других вариантах осуществления данного аспекта иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C) представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C'').

[0231] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид включает структуру формулы (C'),

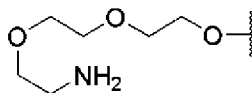


где

$\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T^2$  представляет собой S<sup>-</sup>;



$T^3$  представляет собой группу

, где  $\sim$  указывает точку

присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой H или оксо, при этом обязательно по меньшей мере один из  $R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляет собой оксо, и при этом, когда один из  $R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляет собой оксо, тогда углерод, к которому оксо присоединен, содержит простую связь с азотом кольца в 7-положении;

$R^3$  представляет собой метокси или 2-метоксиэтокси;

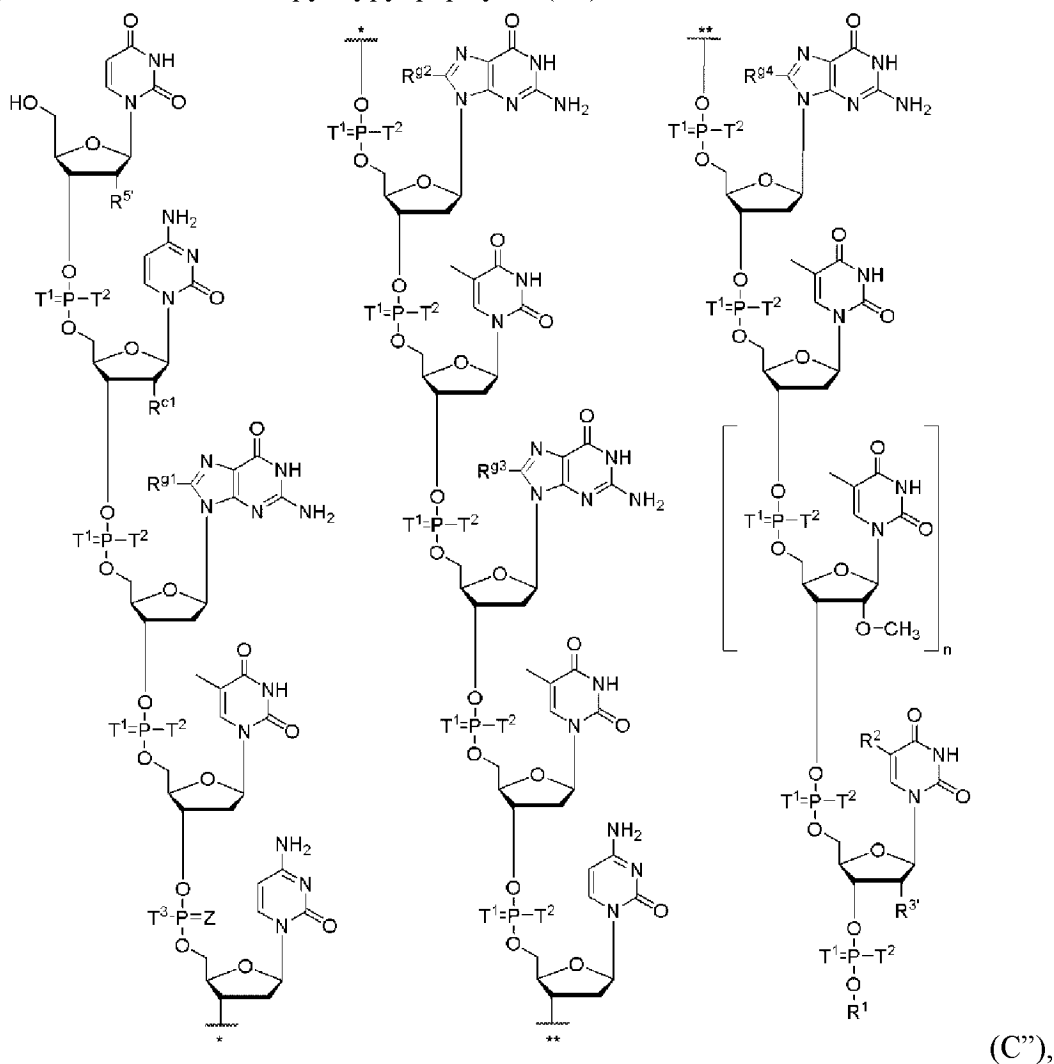
$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

$R^2$  представляет собой  $-H$  или метил; и

$n$  представляет собой целое число от 0 до 2,

или фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

[0232] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид включает структуру формулы (C'')

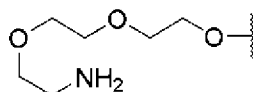


где

$\sim *$  и  $\sim **$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T^2$  представляет собой S<sup>-</sup>;



$T^3$  представляет собой группу

, где  $\sim$  указывает точку

присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^5'$  представляет собой  $-H$  или метокси;



$R^{c1}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой H или оксо, при этом необязательно по меньшей мере один из  $R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляет собой оксо, и при этом, когда один из  $R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляет собой оксо, тогда углерод, к которому оксо присоединен, содержит простую связь с азотом кольца в 7-положении;

$R^{3'}$  представляет собой метокси или 2-метоксиэтокси;

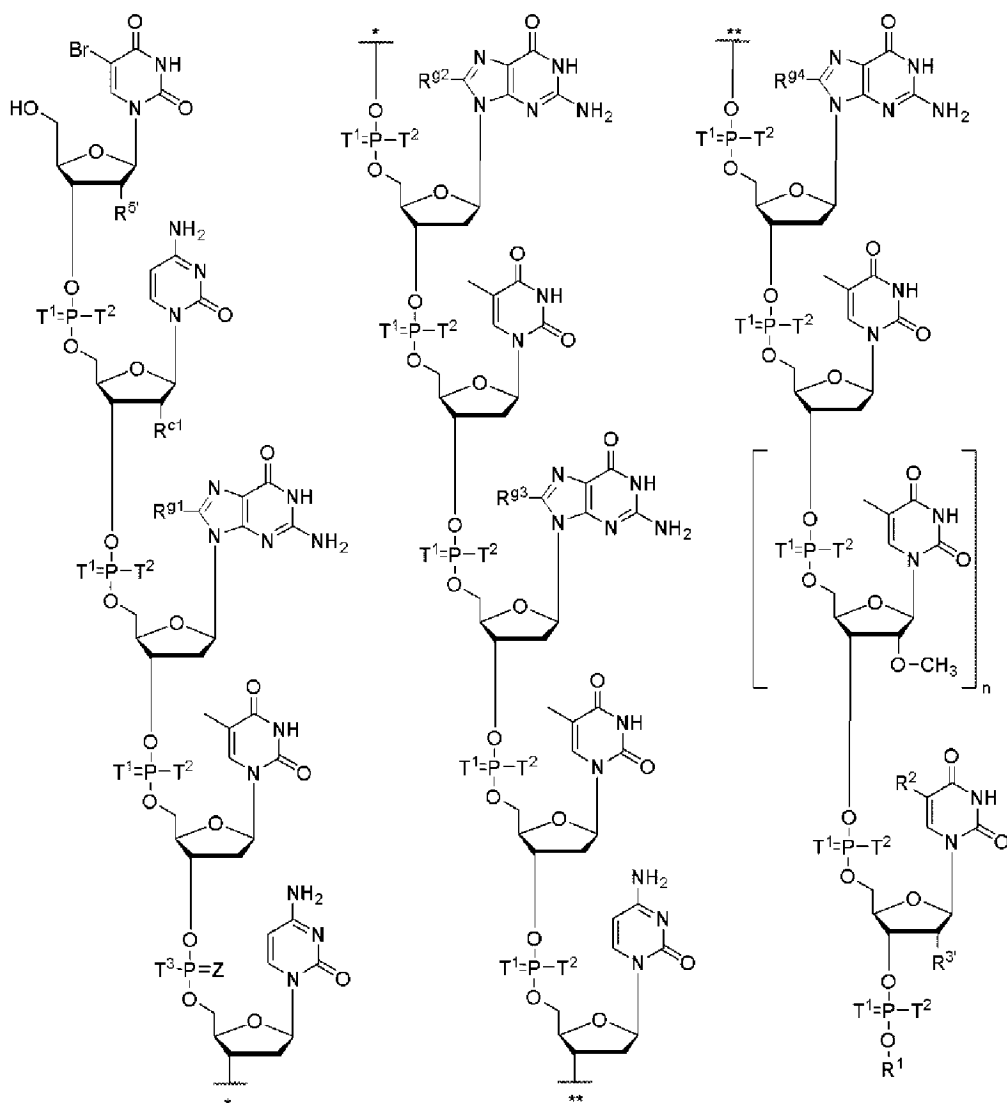
$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

$R^2$  представляет собой -H или метил; и

$n$  представляет собой целое число от 0 до 2,

или фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

[0233] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид включает структуру формулы (C')



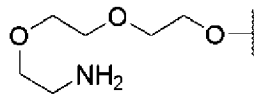
(C'),

где:

$\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T^2$  представляет собой  $S^-$ ;



$T^3$  представляет собой группу

, где  $\sim$  указывает точку

присоединения к остальной части олигонуклеотида;

$Z$  представляет собой  $O$  или  $S$ ;

$R^{5'}$  представляет собой  $-H$  или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой  $-H$  или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой  $H$ ;

$R^{3'}$  представляет собой метокси;

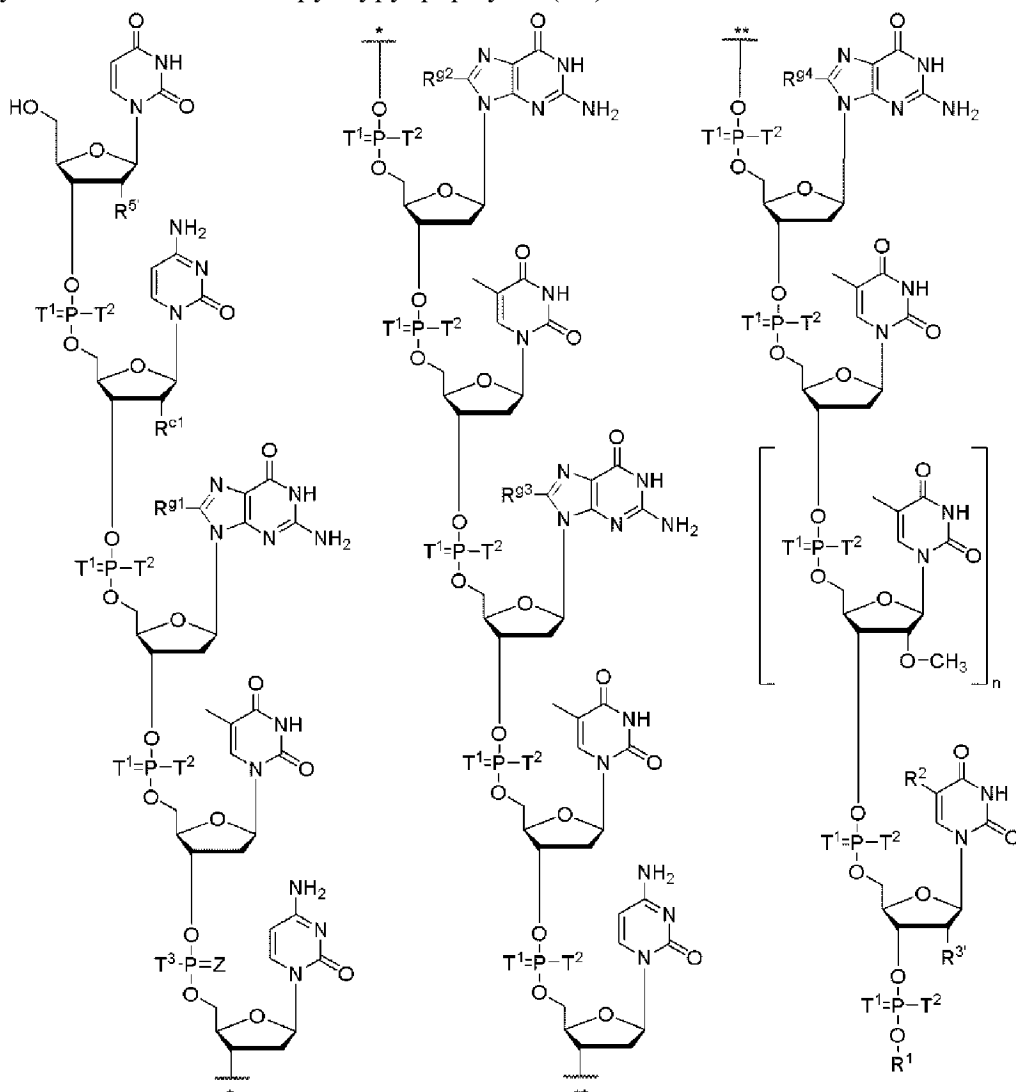
$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

$R^2$  представляет собой  $-H$  или метил; и

$n$  представляет собой целое число от 0 до 2,

или фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

[0234] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид включает структуру формулы (C'')



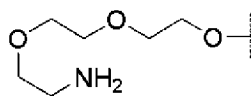
(C''),

где:

$\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T^2$  представляет собой  $S^-$ ;



$T^3$  представляет собой группу

, где  $\sim$  указывает точку

присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой H;

$R^{3'}$  представляет собой метокси;

$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

$R^2$  представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

[0235] В некоторых вариантах осуществления данного аспекта Z представляет собой S. В дополнительных вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере одну пару геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой  $S^-$ . В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой  $S^-$ . Пара(пары) геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой  $S^-$ , также может быть описана как фосфородитионатные связи.

[0236] Должно быть понятно, что в некоторых случаях, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну пару геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой  $S^-$ , фосфородитионатная связь(связи) также может быть описана в контексте положения в олигонуклеотиде, в котором находится связь. Положение связи может быть охарактеризовано, например, как находящееся между двумя нуклеозидными остатками, *например*, между первым и вторым нуклеозидными остатками (или между нуклеозидными остатками 1 и 2), считая от 5'-конца олигонуклеотида. Альтернативно, положение связи может быть описано как 3'-положение данного нуклеозидного остатка, *например*, на межнуклеозидном линкере сразу после указанного нуклеозидного остатка или 3'-положение 3-концевого остатка.

[0237] В некоторых вариантах осуществления, где олигонуклеотид включает по меньшей мере одну пару геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой  $S^-$ , и где n имеет значение 0, по меньшей мере одна фосфородитионатная связь находится между нуклеозидными остатками 1 и 2, между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между

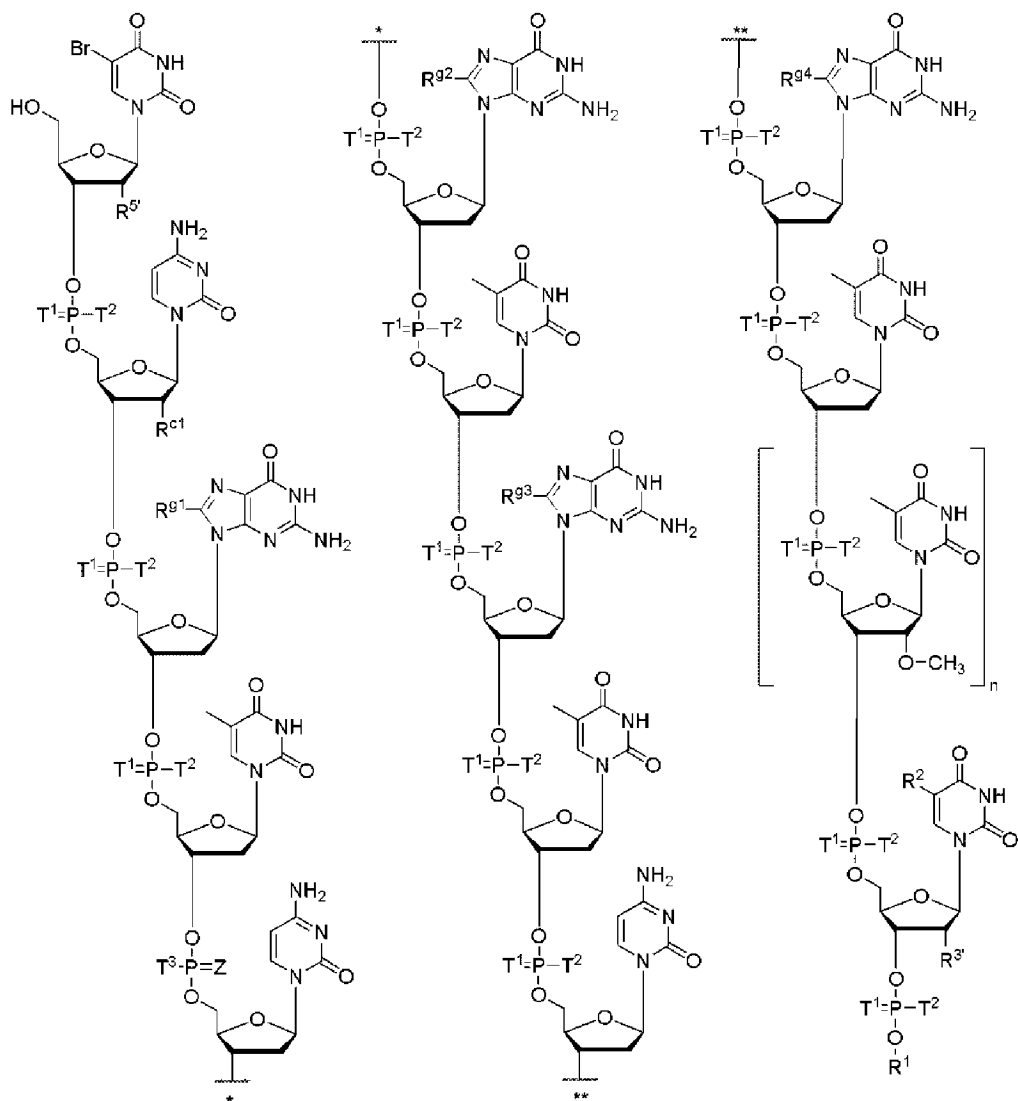


положении нуклеозидного остатка 1, нуклеозидного остатка 2, нуклеозидного остатка 3, нуклеозидного остатка 5, нуклеозидного остатка 6, нуклеозидного остатка 7, нуклеозидного остатка 8, нуклеозидного остатка 9, нуклеозидного остатка 10, нуклеозидного остатка 11, нуклеозидного остатка 12, нуклеозидного остатка 13 или нуклеозидного остатка 14.

[0240] В некоторых вариантах осуществления, где олигонуклеотид включает по меньшей мере одну пару геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой  $S^-$ , и где n имеет значение 2, по меньшей мере одна фосфородитионатная связь находится между нуклеозидными остатками 1 и 2, между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10, между нуклеозидными остатками 10 и 11, между нуклеозидными остатками 11 и 12, между нуклеозидными остатками 12 и 13, или между остатками 13 и 14. В некоторых вариантах осуществления, где олигонуклеотид включает по меньшей мере одну пару геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой  $S^-$ , и где n имеет значение 2, по меньшей мере одна фосфородитионатная связь находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 1, нуклеозидного остатка 2, нуклеозидного остатка 3, нуклеозидного остатка 5, нуклеозидного остатка 6, нуклеозидного остатка 7, нуклеозидного остатка 8, нуклеозидного остатка 9, нуклеозидного остатка 10, нуклеозидного остатка 11, нуклеозидного остатка 12, нуклеозидного остатка 13, нуклеозидного остатка 14 или остатка 15.

[0241] В других вариантах осуществления, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере две фосфородитионатные связи или включает по меньшей мере две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой  $S^-$ , положения одной или обеих фосфородитионатных связей или пар  $T^1$  и  $T^2$  могут быть определены. Должно быть понятно, что положения одной или обеих фосфородитионатных связей могут независимо варьироваться.

[0242] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид включает структуру формулы (C'),



(C'),

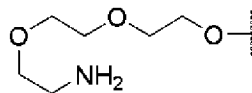
где:

$\sim *$  и  $\sim **$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T^2$  представляет собой S<sup>-</sup>;

$T^3$  представляет собой группу



, где  $\sim$  указывает точку

присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой H;

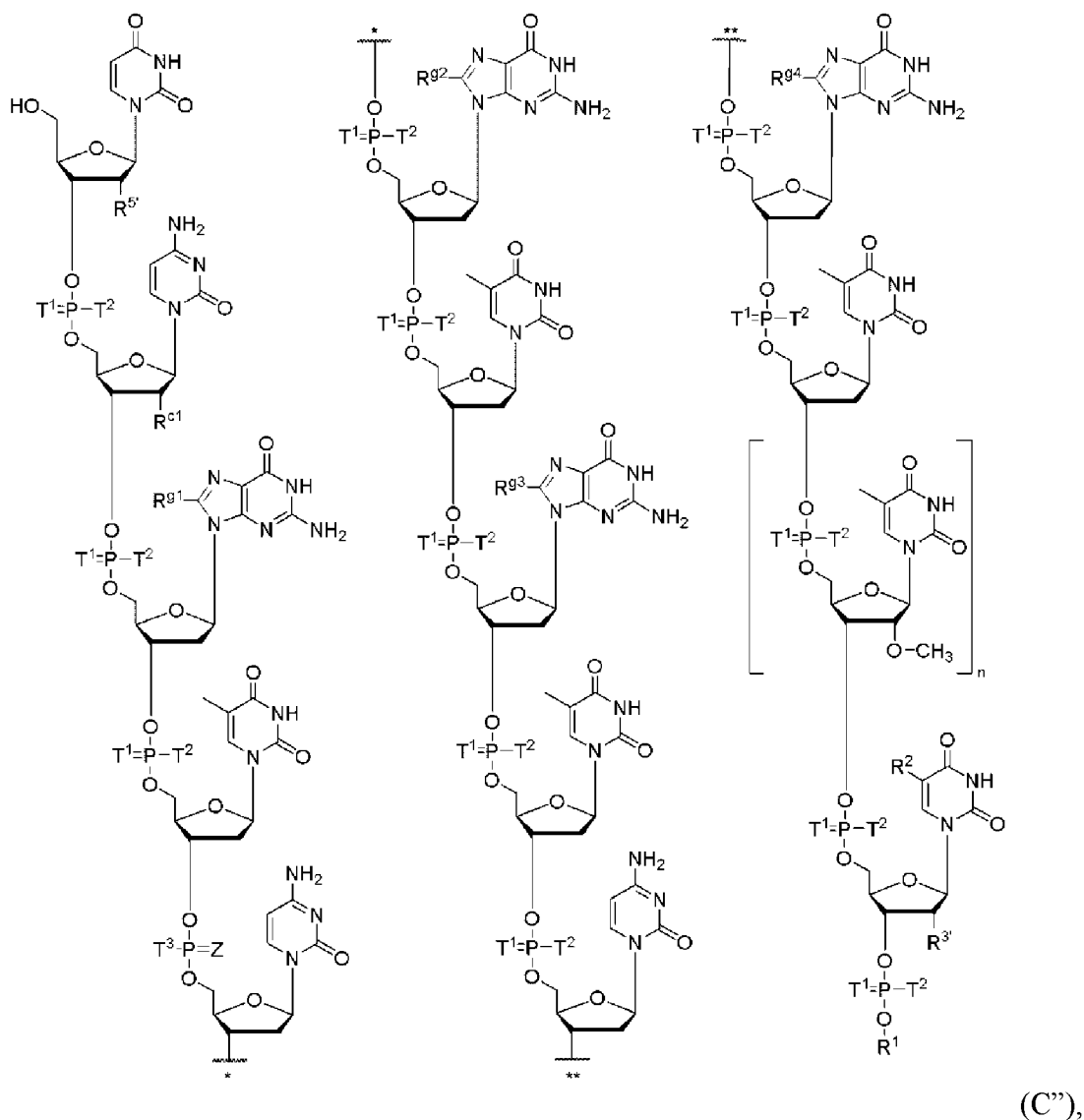
$R^{3'}$  представляет собой метокси;

$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

$R^2$  представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,  
или фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

[0243] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид включает структуру формулы (C''),



где:

$\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T^2$  представляет собой S<sup>-</sup>;



, где  $\sim$  указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой H;

$R^{3'}$  представляет собой метокси;

$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

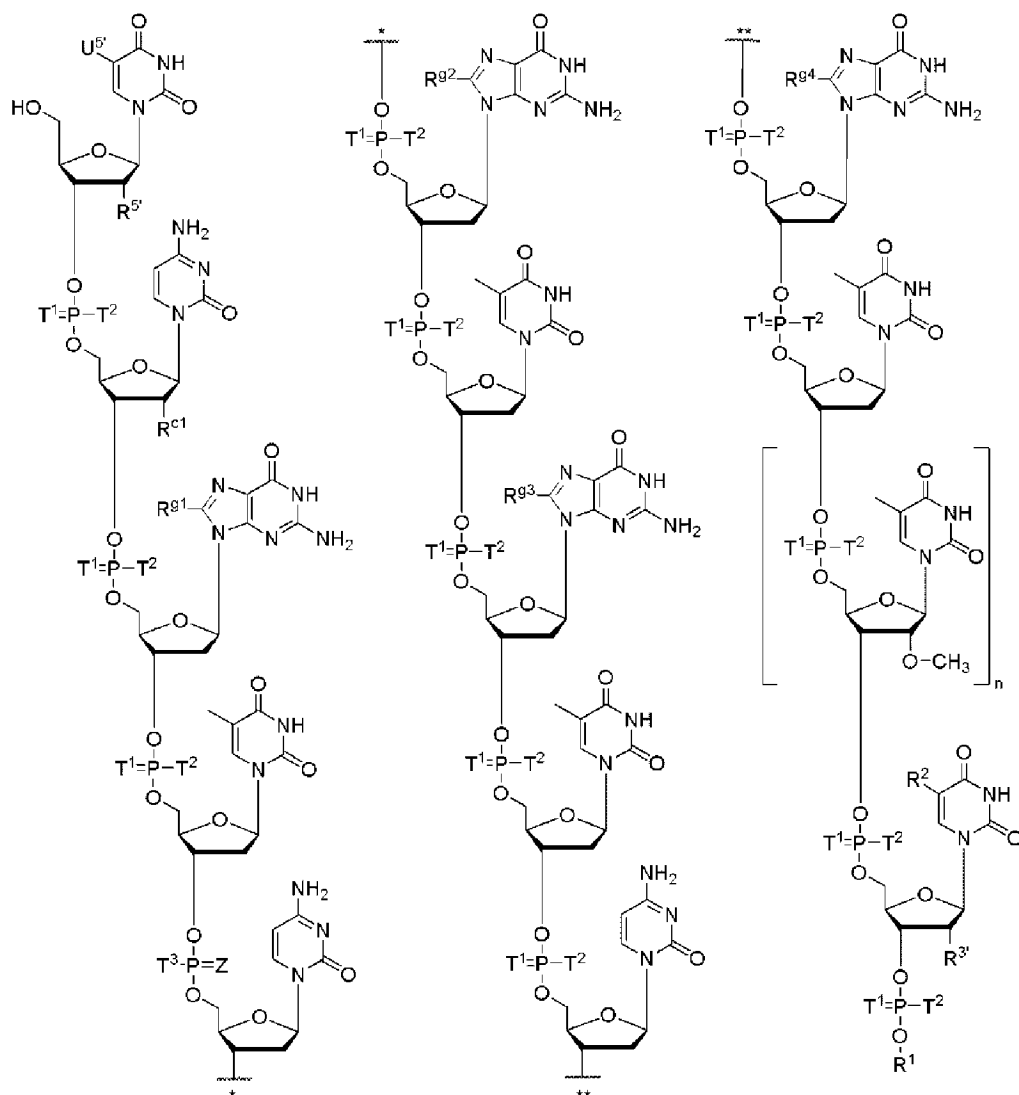
$R^2$  представляет собой -H или метил; и

$n$  представляет собой целое число от 0 до 2,

или фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

[0244] В некоторых вариантах осуществления данного аспекта  $Z$  представляет собой  $S$ . В дополнительных вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере одну пару геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S^-$ . В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S^-$ .

[0245] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает структуру формулы (C),



(C),

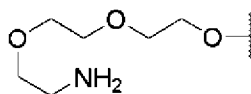
где  $\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

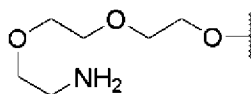



каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T^2$  представляет собой S<sup>-</sup>;

при условии, что олигонуклеотид включает по меньшей мере одну пару геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S,



$T^3$  представляет собой группу , где  указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$  представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$  представляет собой -H;

$R^{c1}$  представляет собой -H;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой H;

$R^{3'}$  представляет собой метокси;

$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

$R^2$  представляет собой -метил; и

n имеет значение 1,

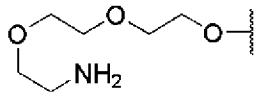
или фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

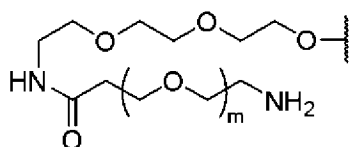
[0246] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных выше по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находится между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11. В других вариантах осуществления вышеописанного олигонуклеотид включает по меньшей мере две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, и где по меньшей мере две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находятся между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11.

[0247] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает одну или две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, и где одна или две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$  находятся между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает одну пару геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и

$T^2$  представляет собой S, и где пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$  находится между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11. В некоторых других вариантах осуществления олигонуклеотид включает две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, и где две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находятся между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11

[0248] В некоторых вариантах осуществления  $R^{5'}$  представляет собой H. В других вариантах осуществления  $R^{5'}$  представляет собой метокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^{c1}$  представляет собой H. В других вариантах осуществления  $R^{c1}$  представляет собой метокси. В других вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой метил. В некоторых других вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой H. В дополнительных вариантах осуществления, которые можно комбинировать с любыми из

описанных выше вариантов осуществления,  $T^3$  представляет собой . В некоторых других вариантах осуществления  $T^3$  представляет собой



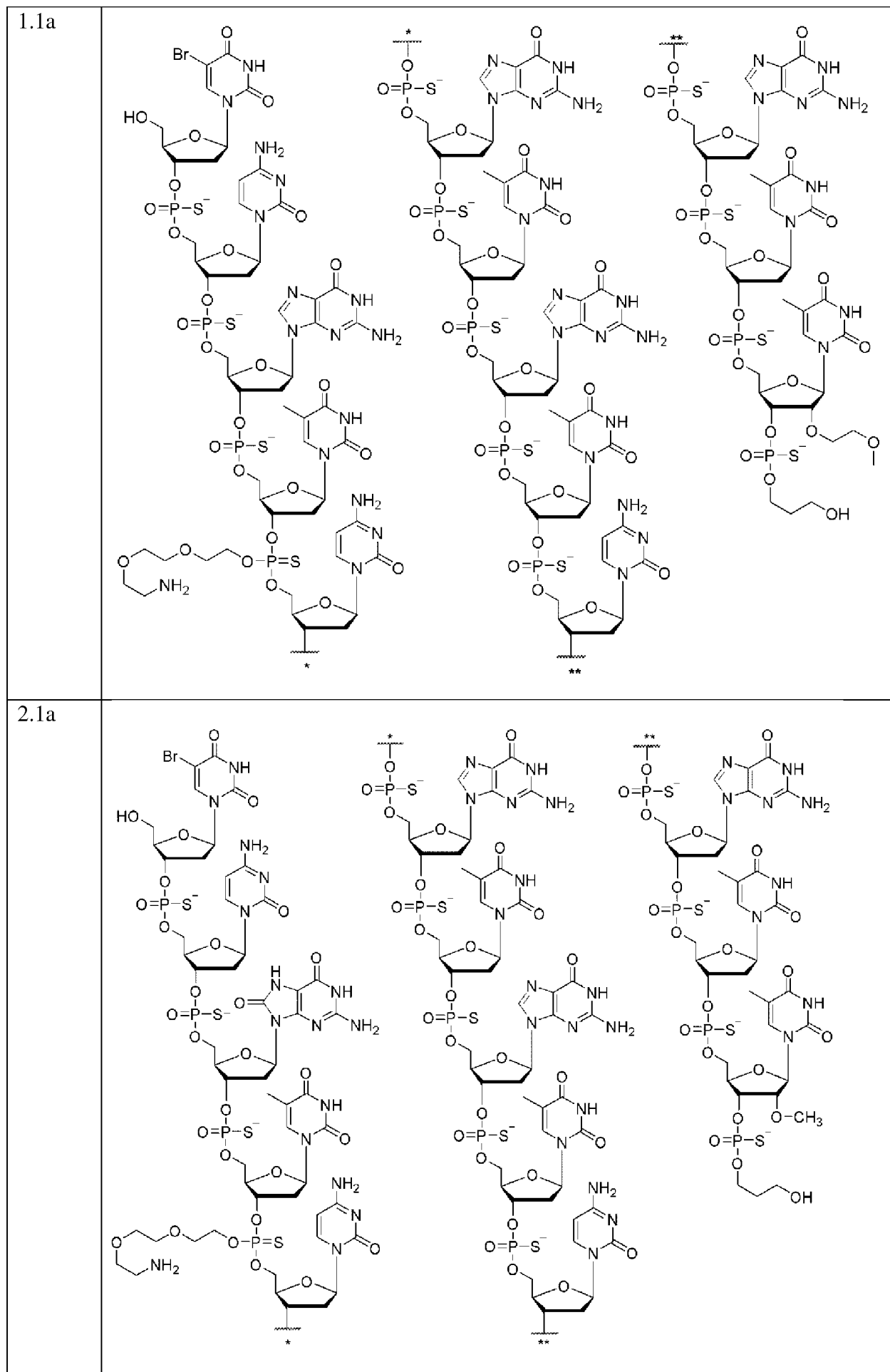
. В некоторых вариантах осуществления  $m$  представляет собой целое число от 20 до 25.

[0249] В другом аспекте иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C) представляет собой олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов Таблицы 3 и Таблицы 4, или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых других вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C) представляет собой олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов Таблицы 4, или его фармацевтически приемлемую соль.

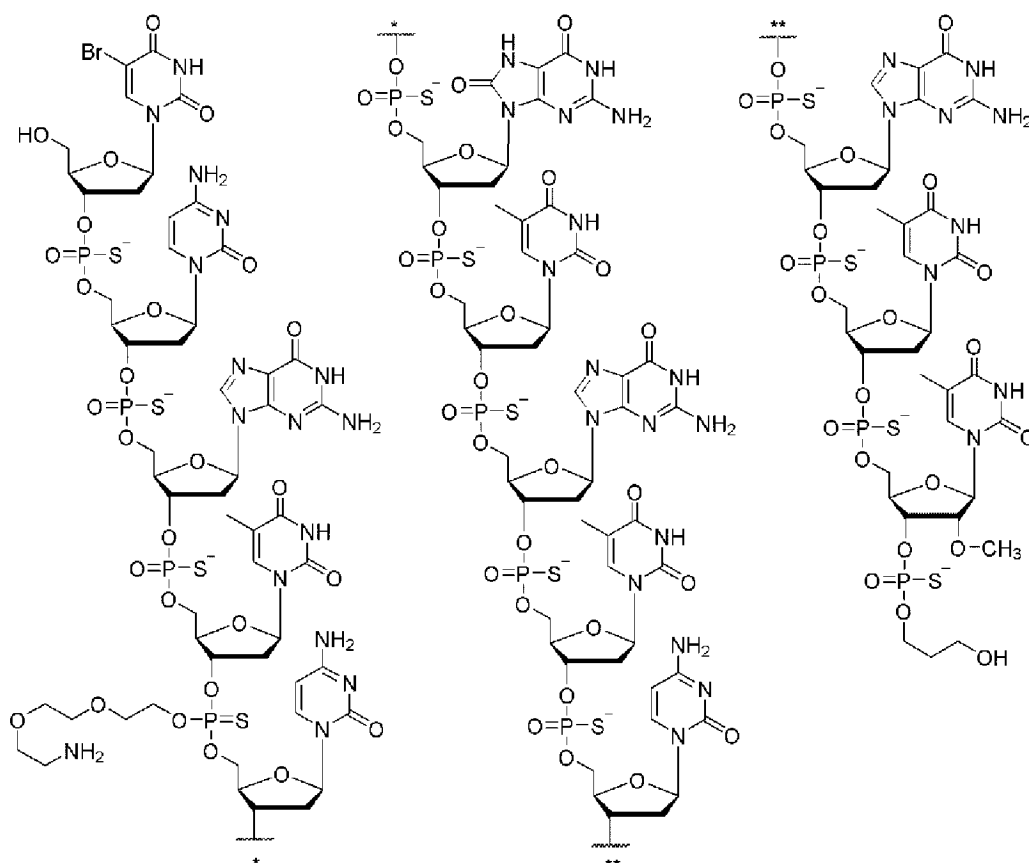
Таблица 3

Структуры модифицированных олигонуклеотидов (с PEG<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>)

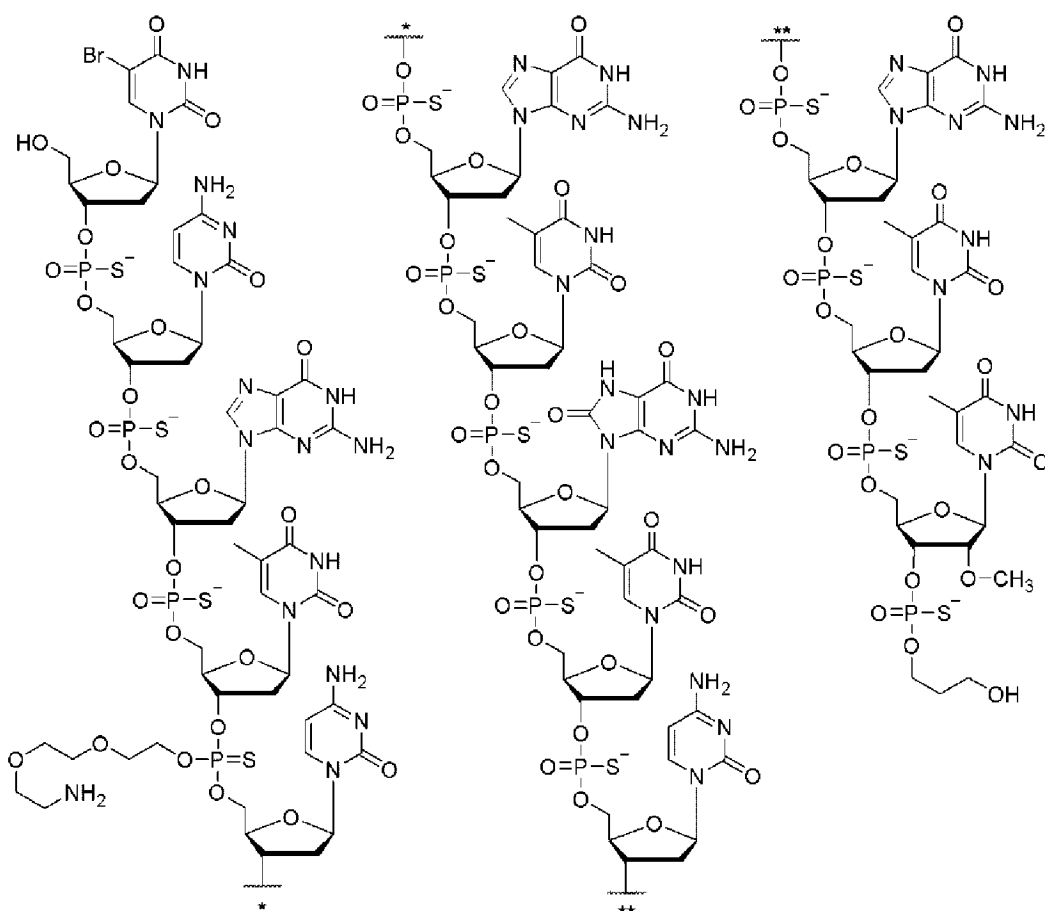
| Соед.<br>№ | Структура |
|------------|-----------|
|------------|-----------|



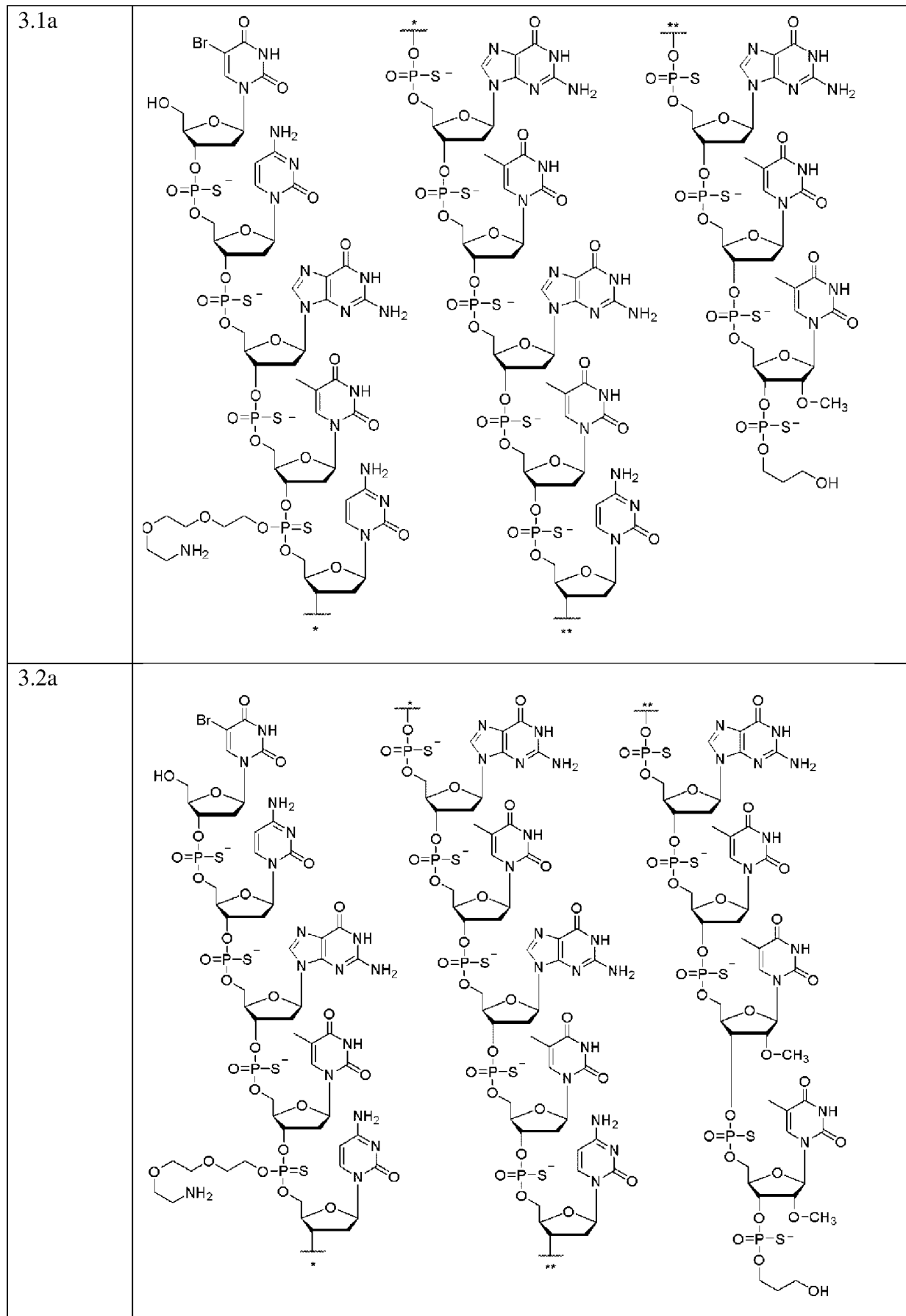
2.2a



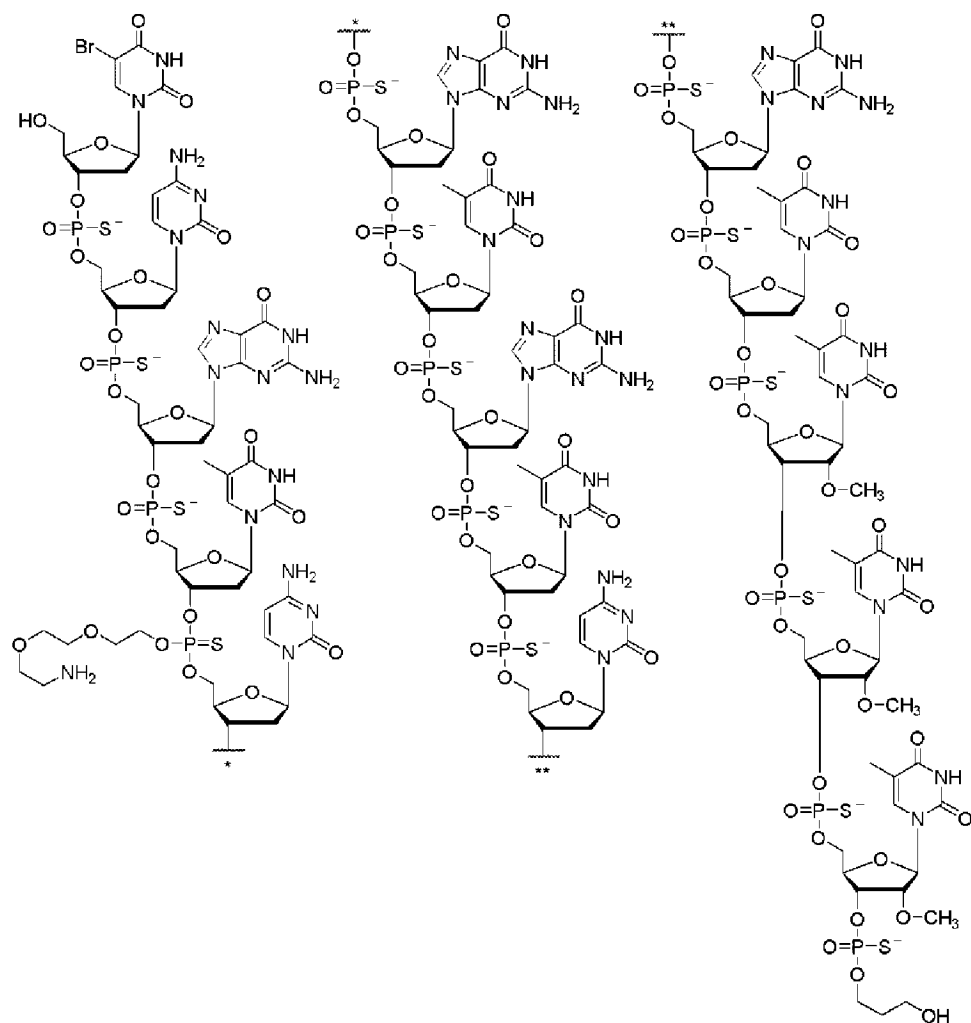
2.3a





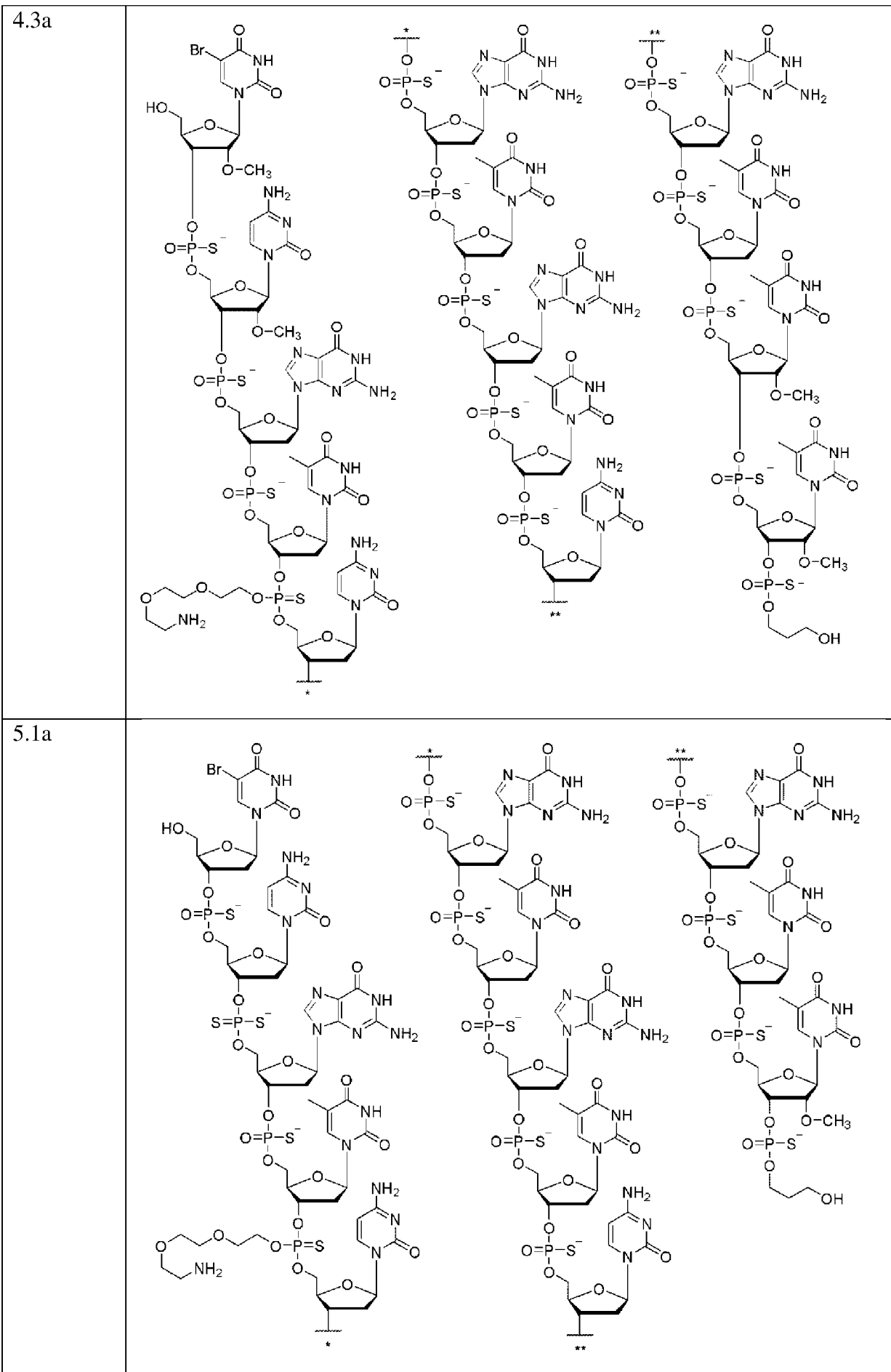


3.3a

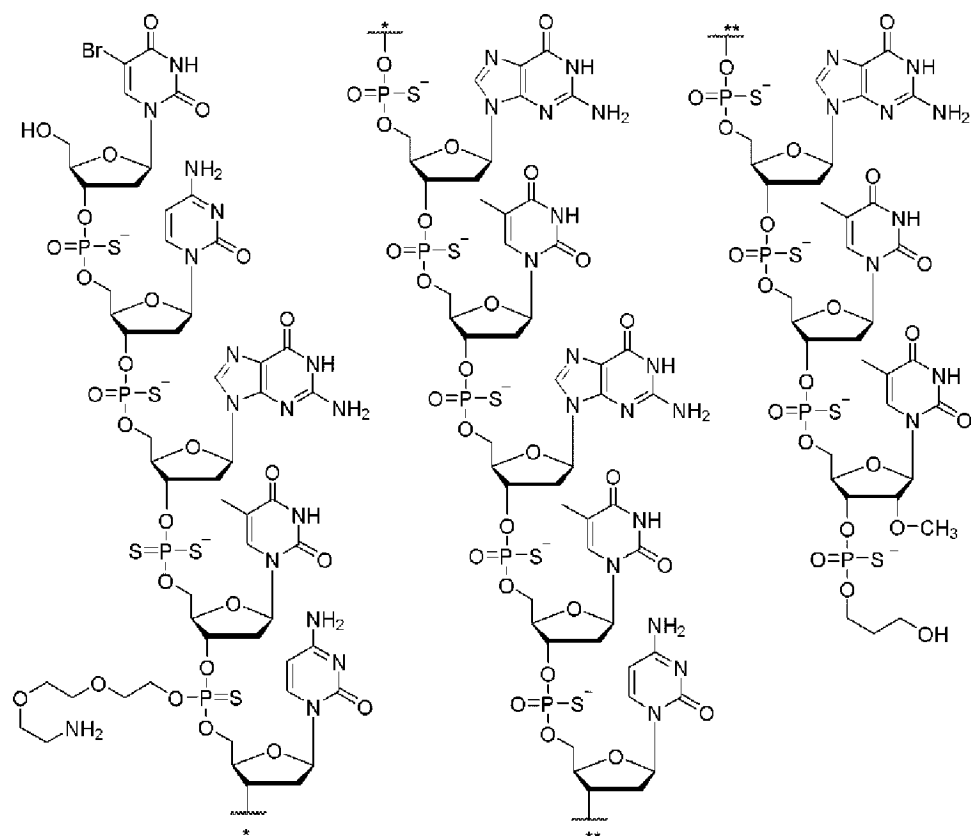




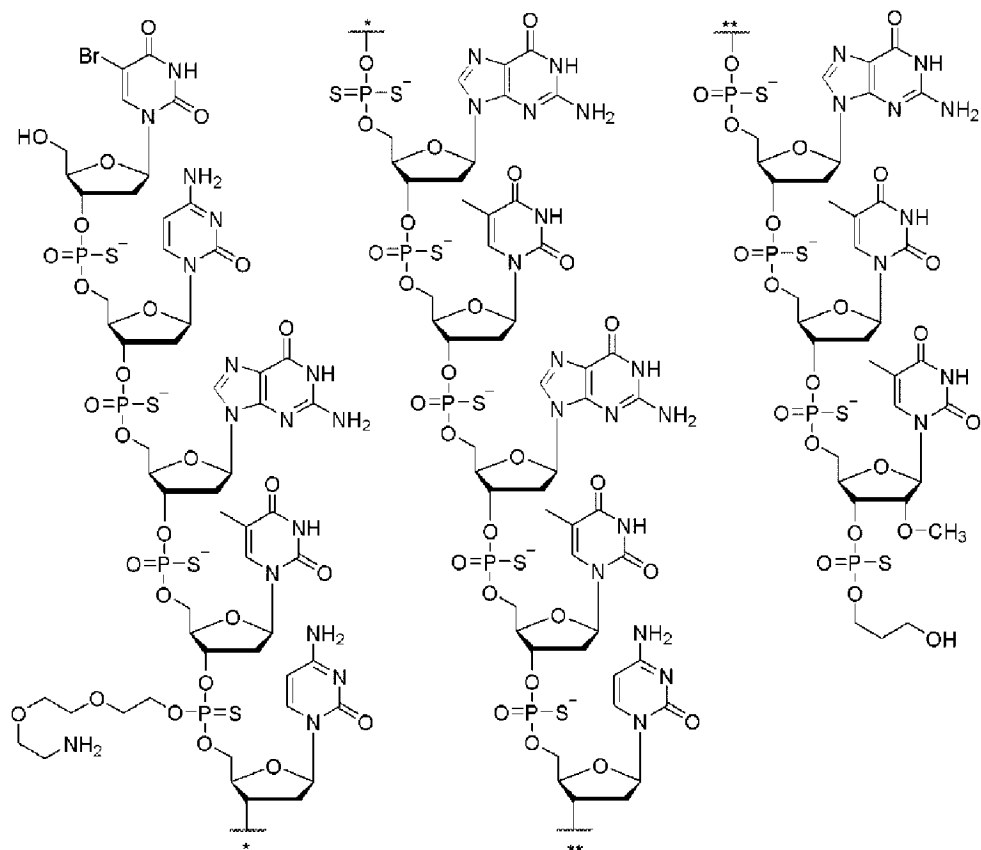




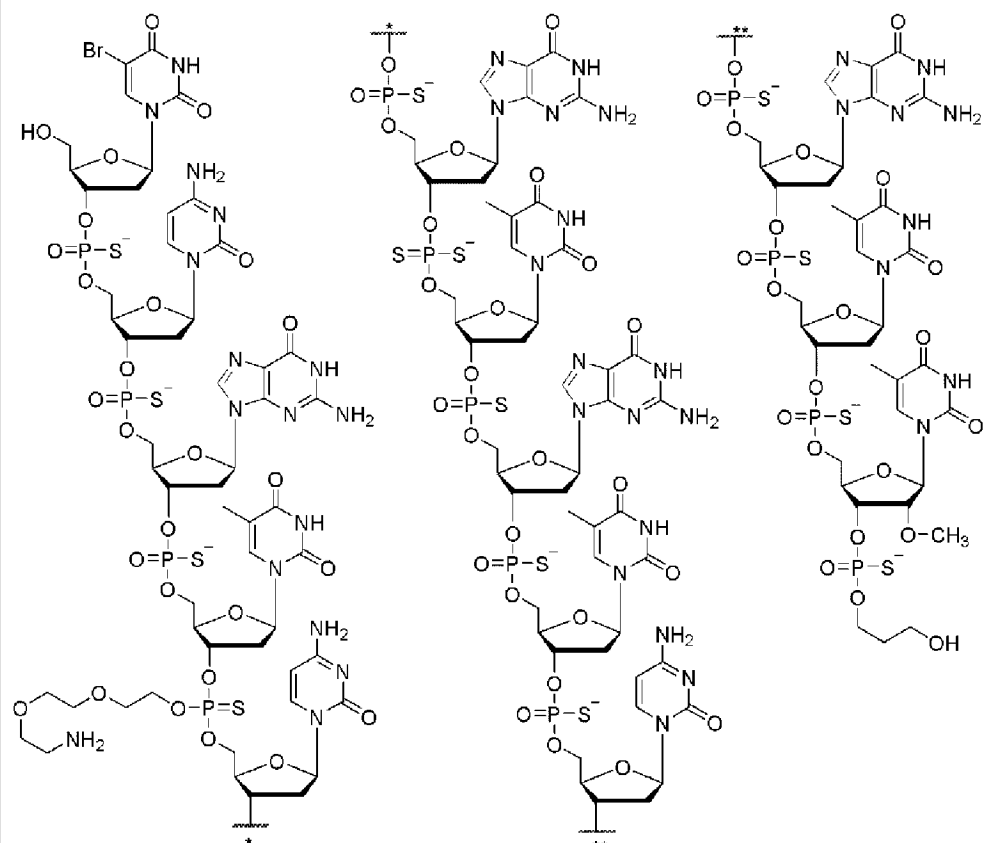
5.2a



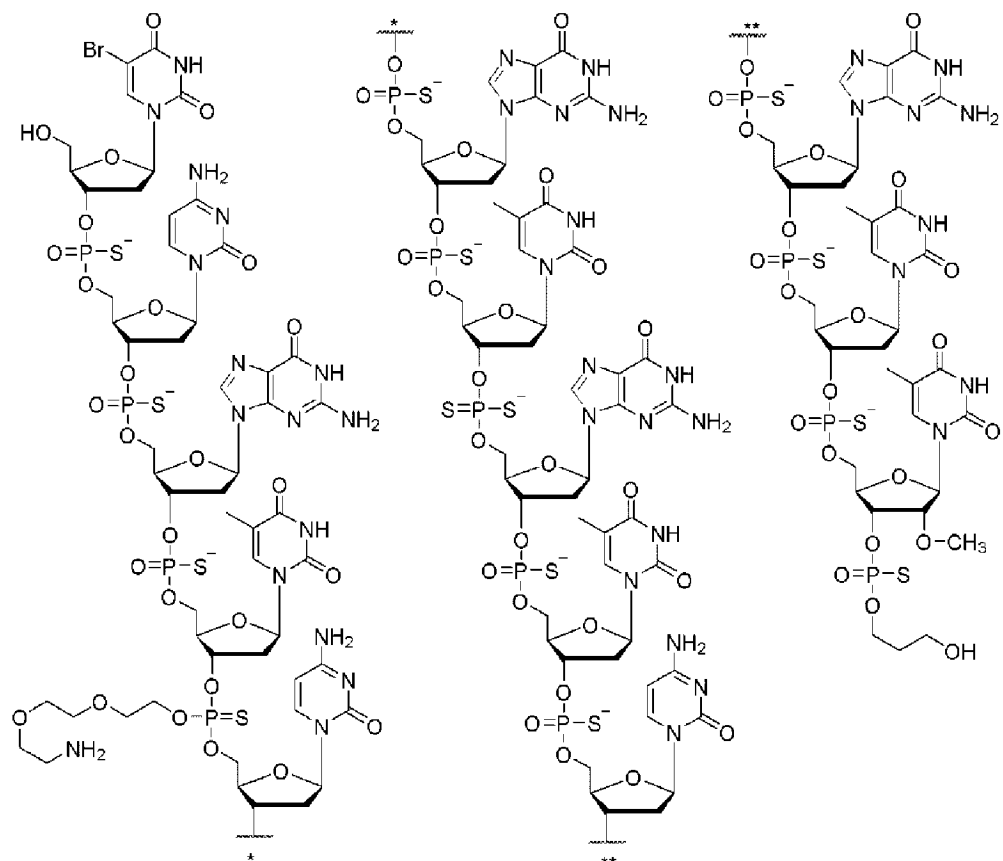
5.3a



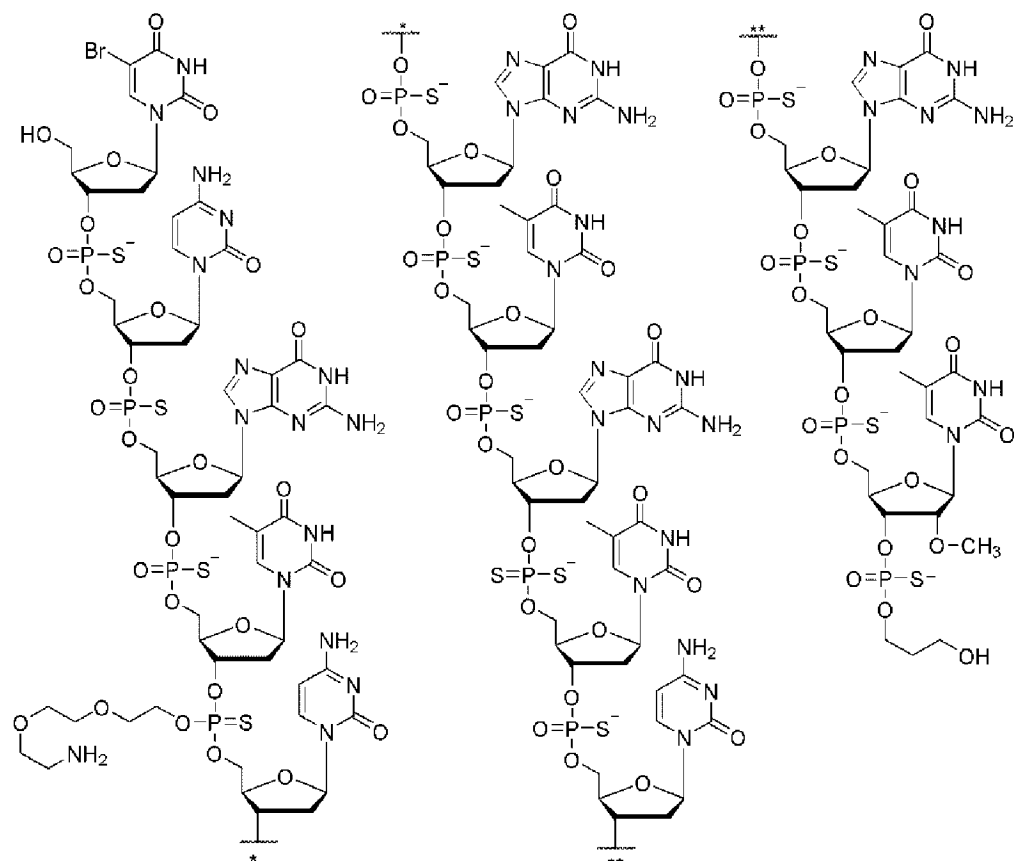
5.4a



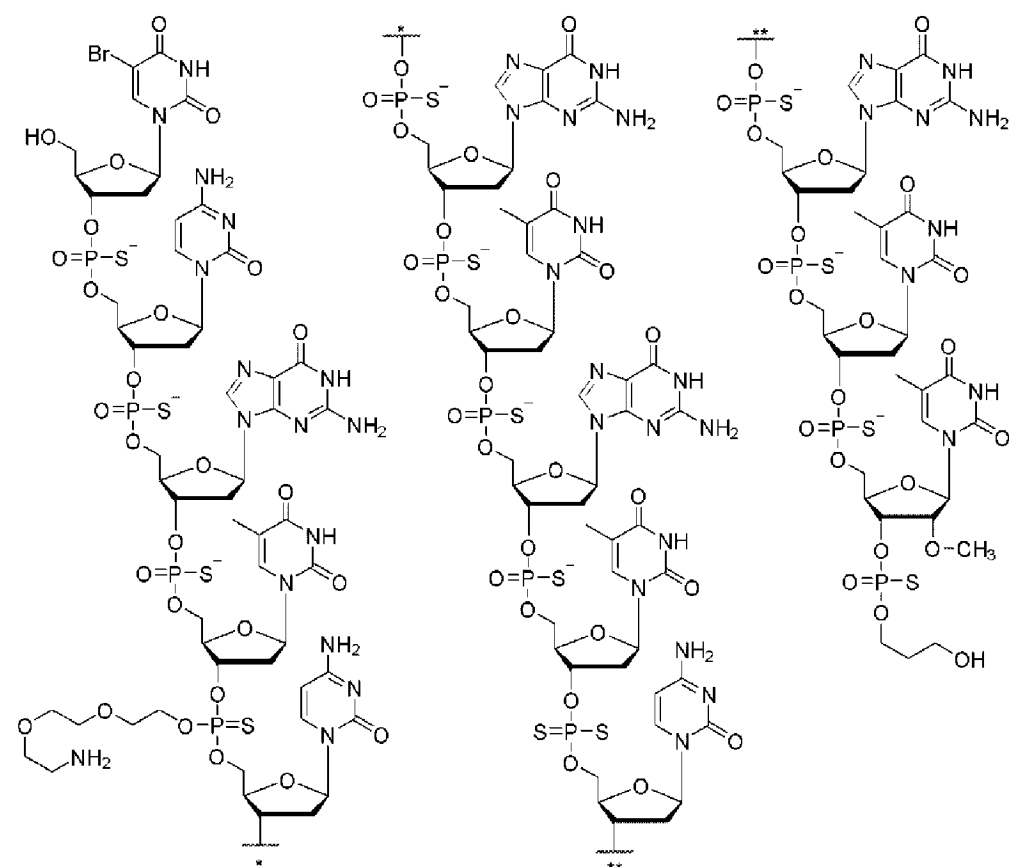
5.5a



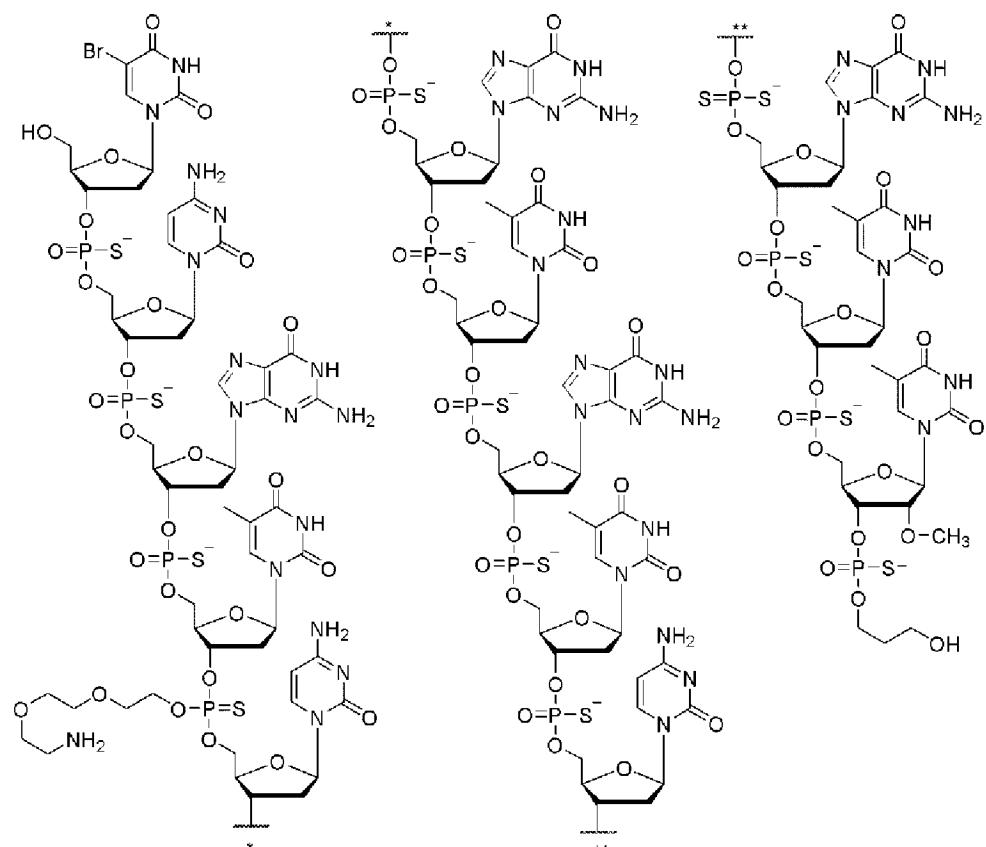
5.6a



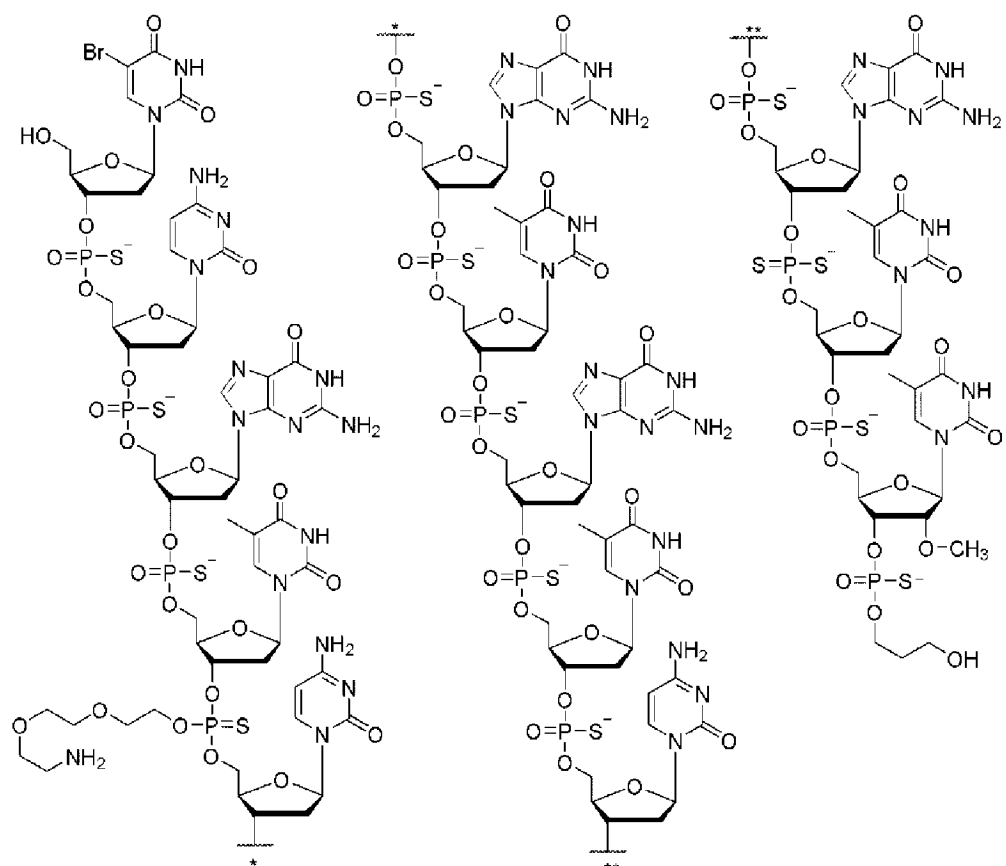
5.7a

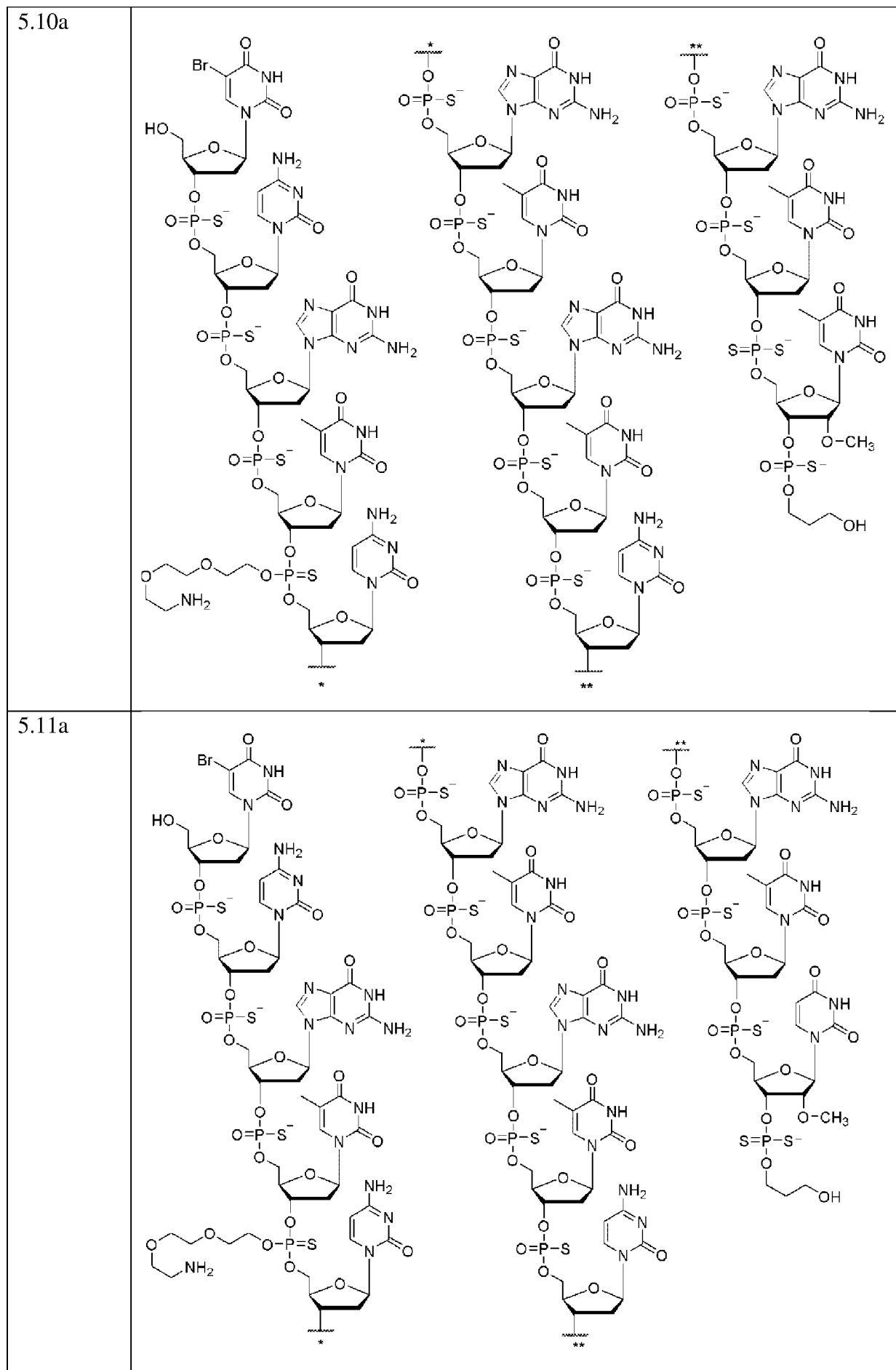


5.8a



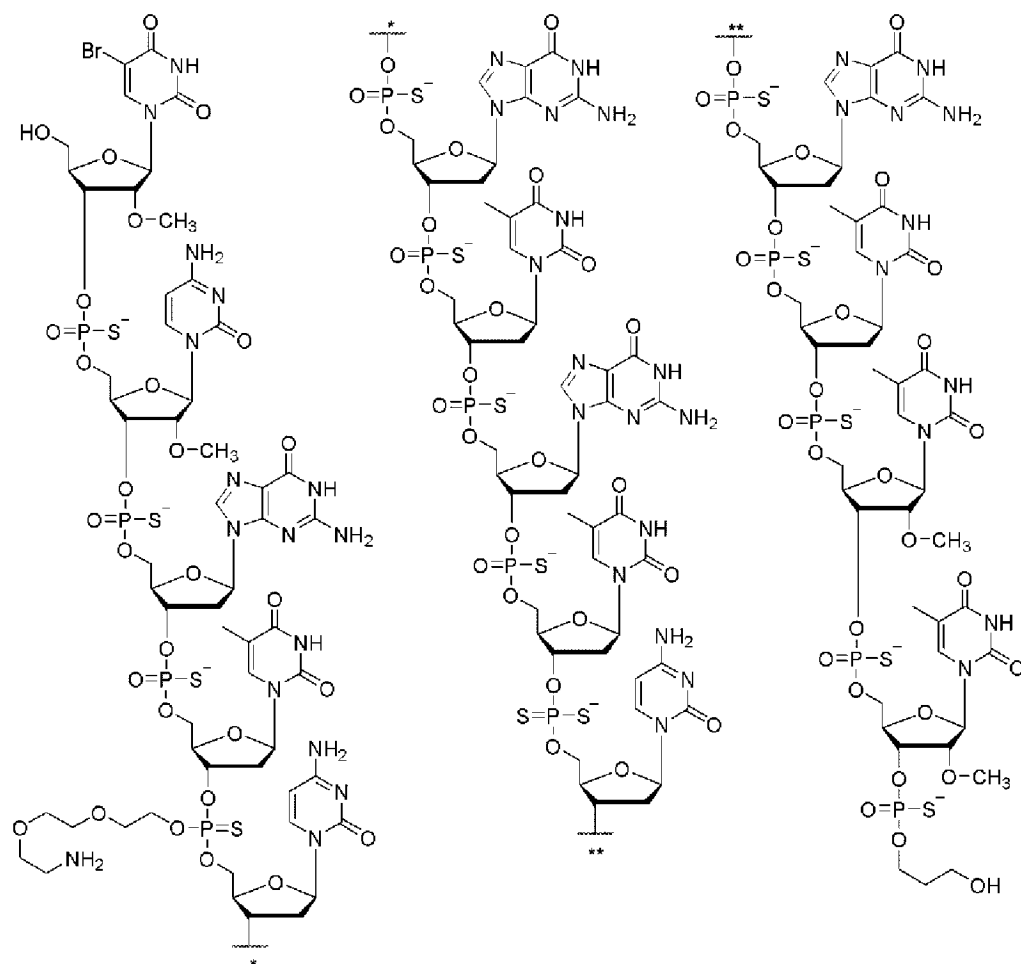
5.9a







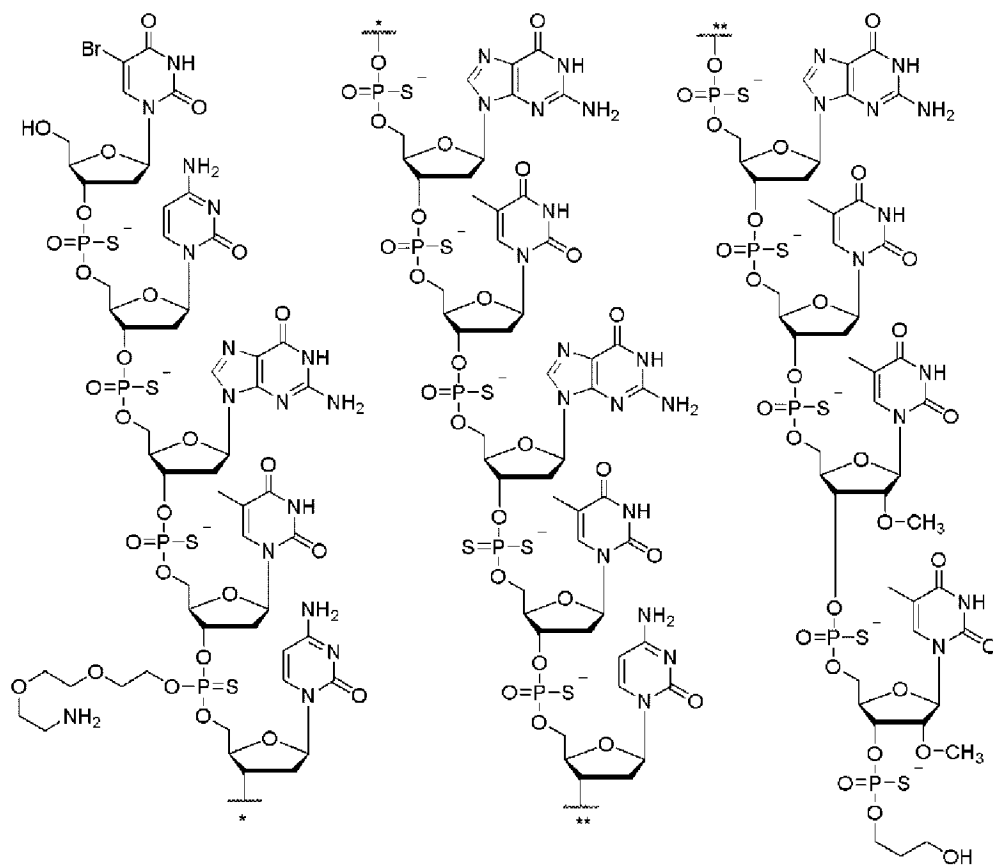
6.2a



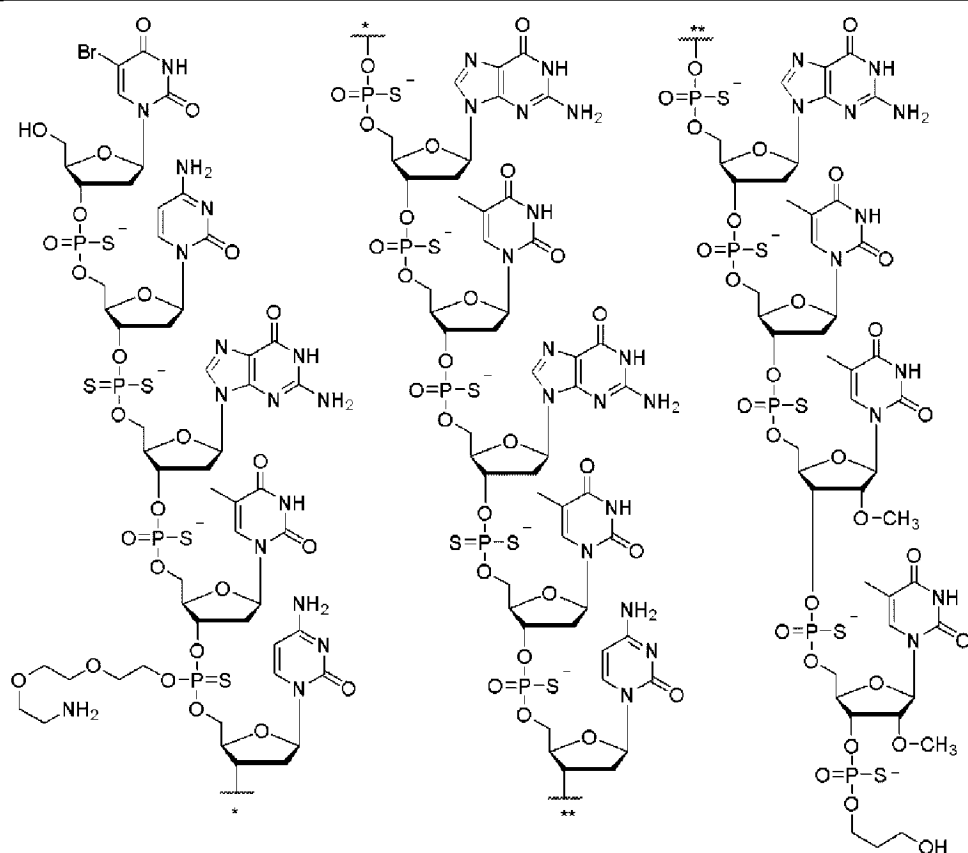




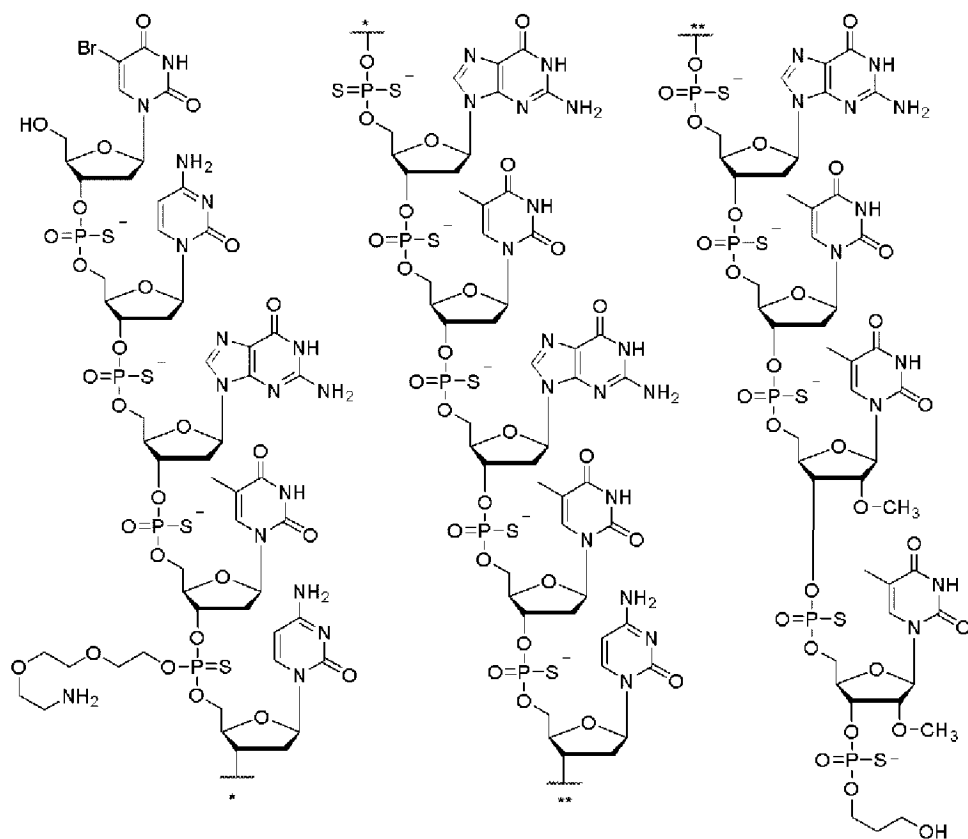
7.2a



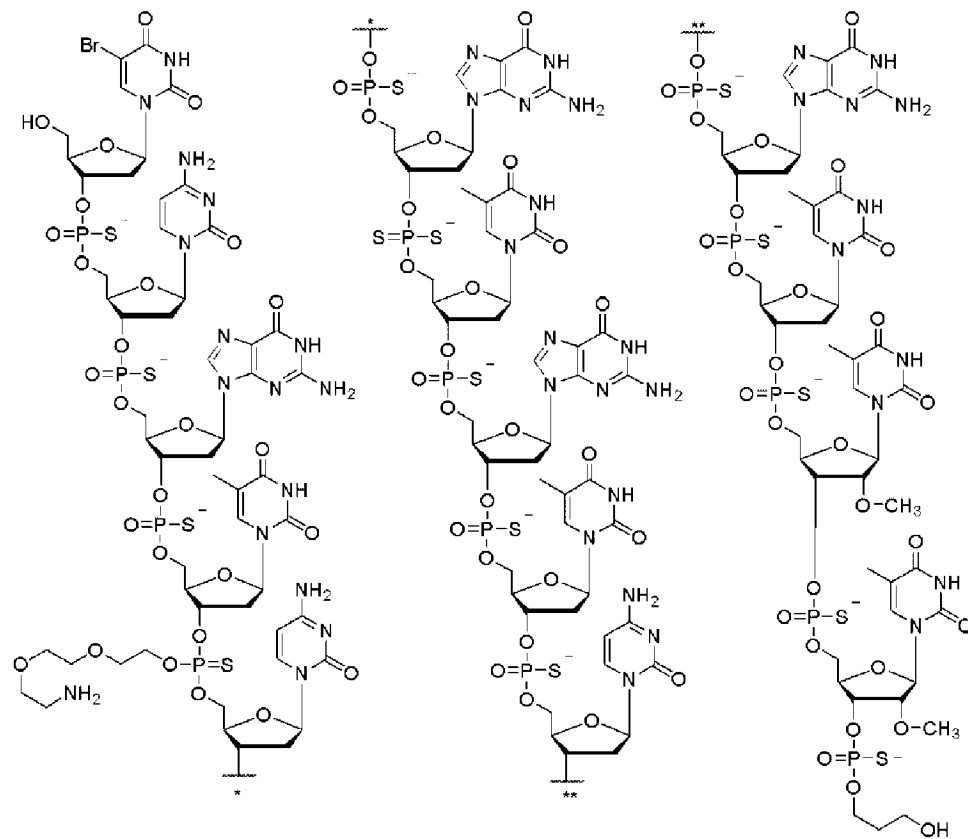
7.3a



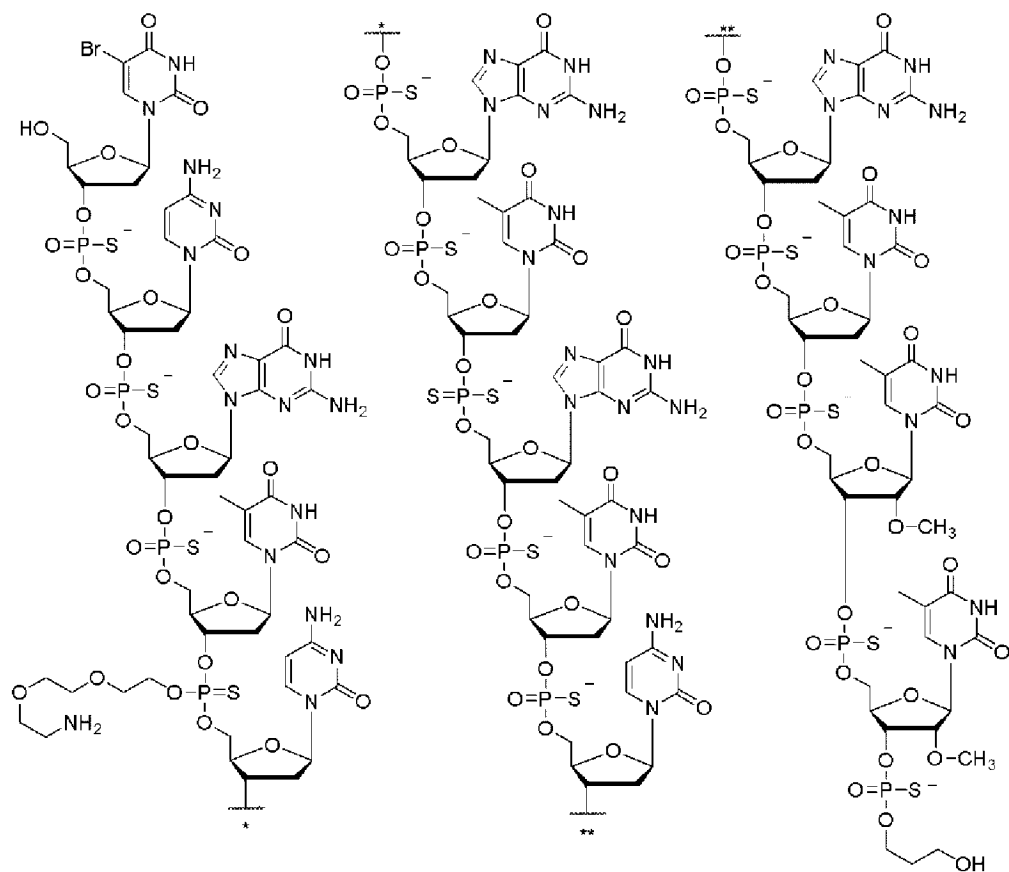
7.4a



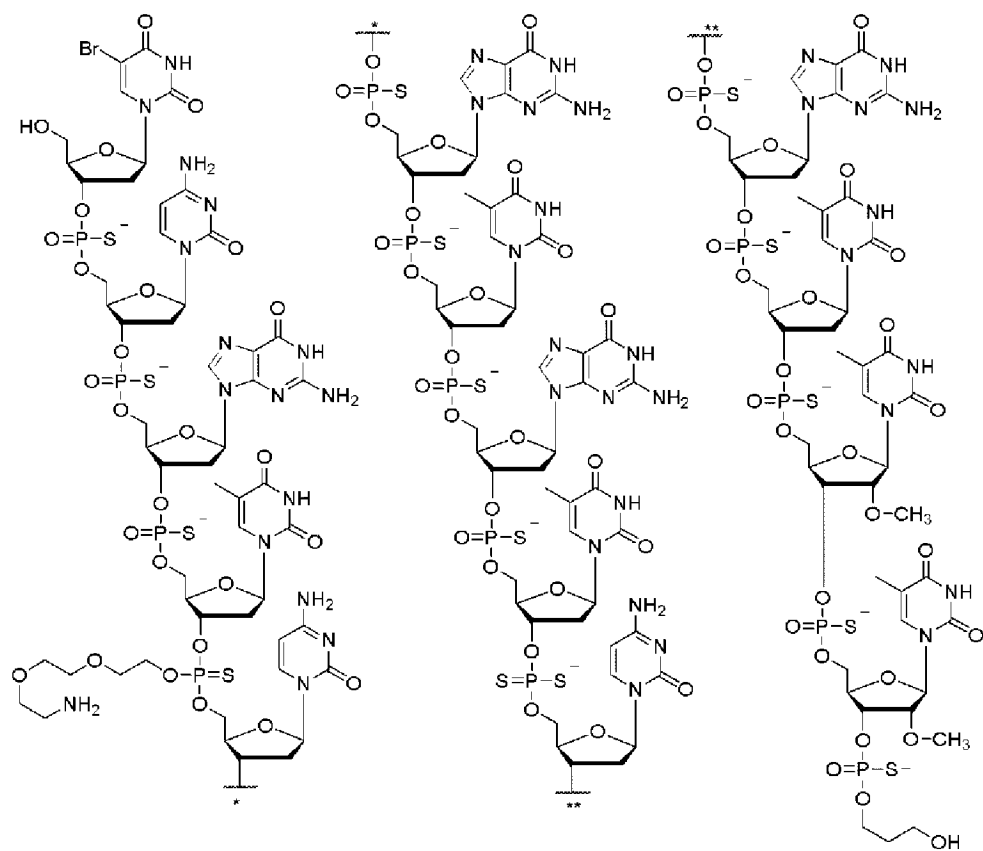
7.5a



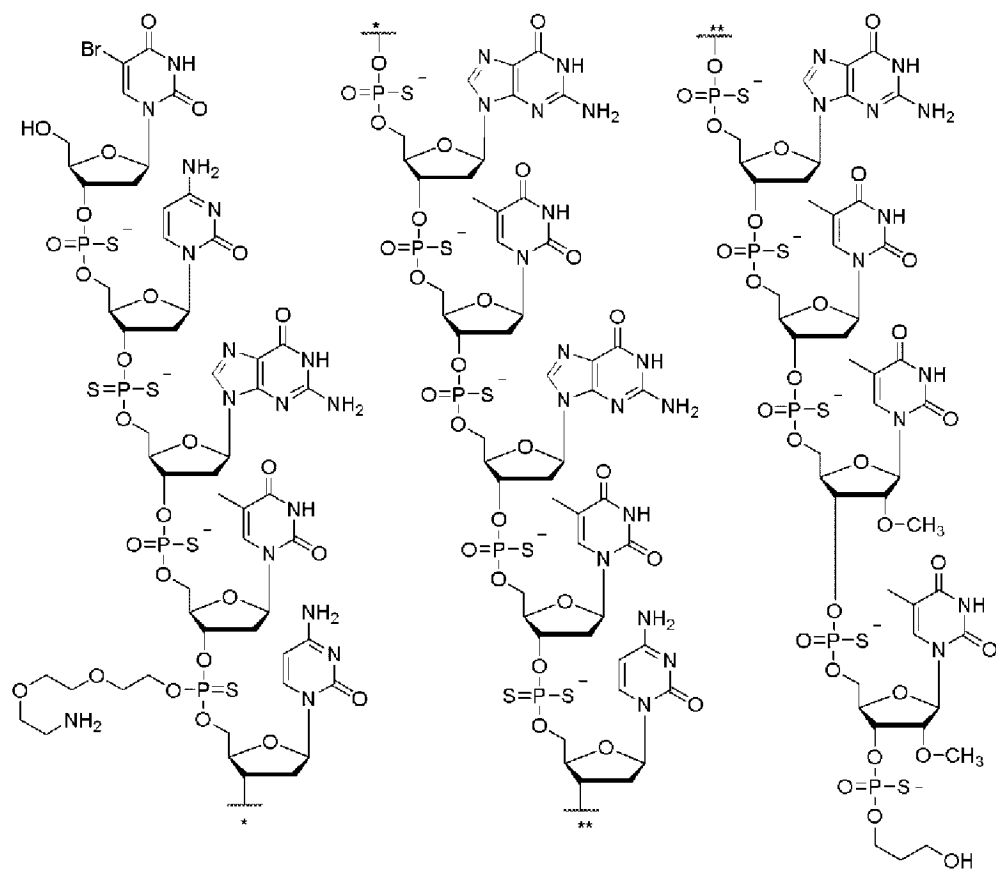
7.6a



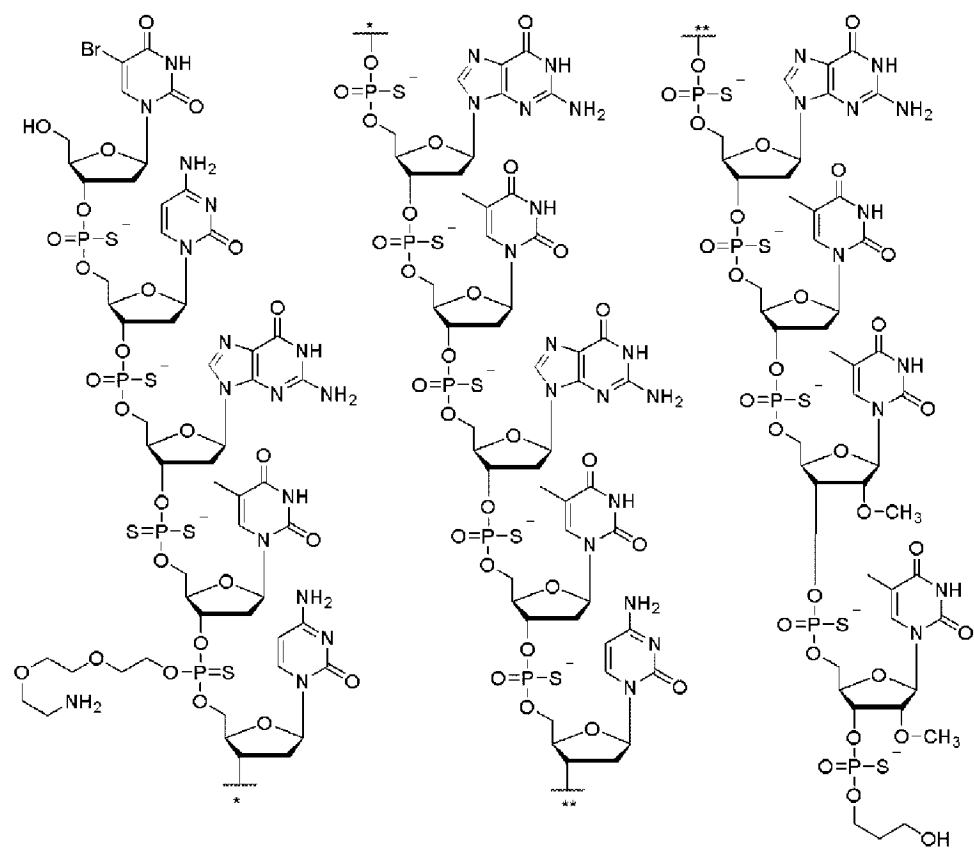
7.7a

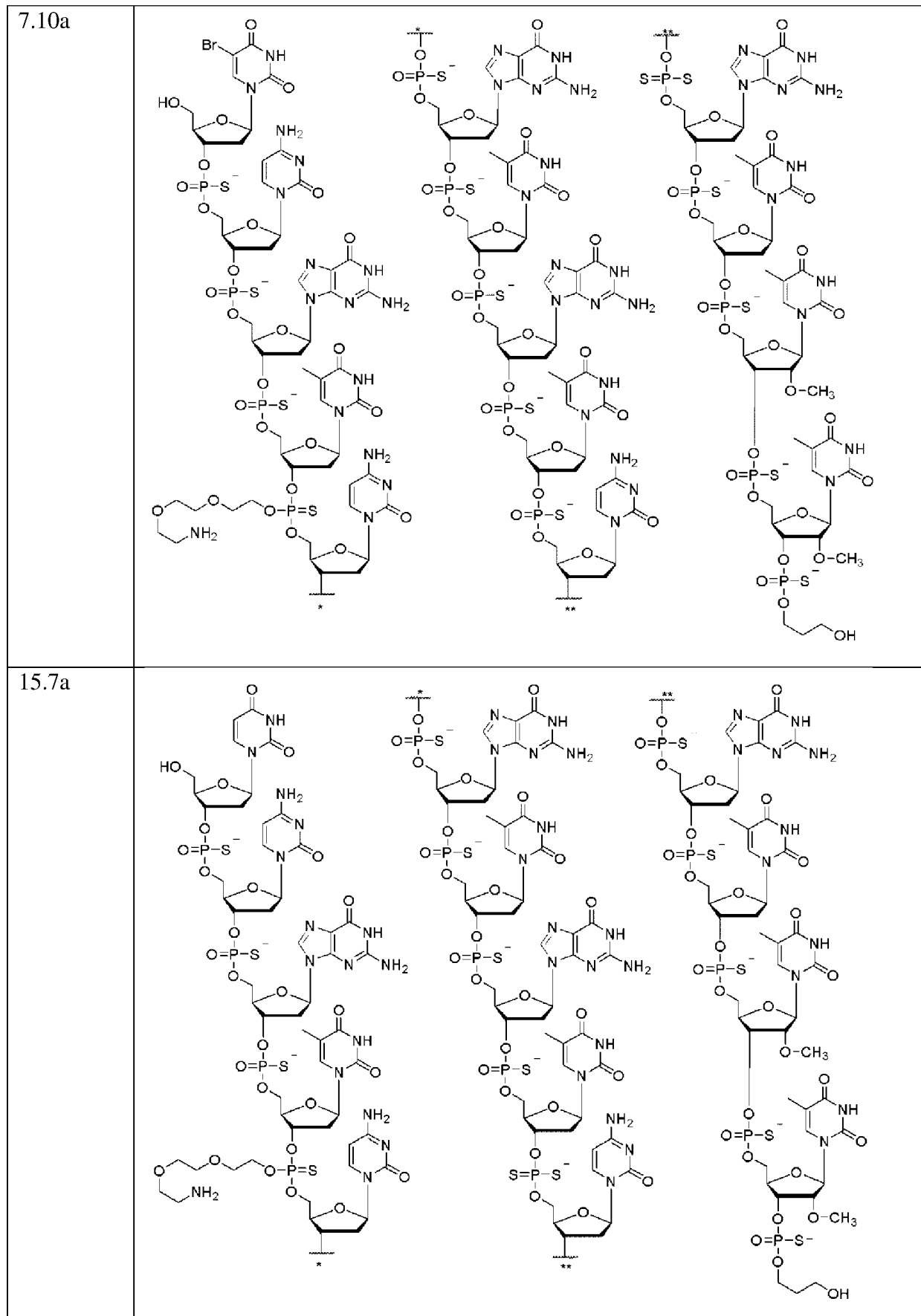


7.8a



7.9a

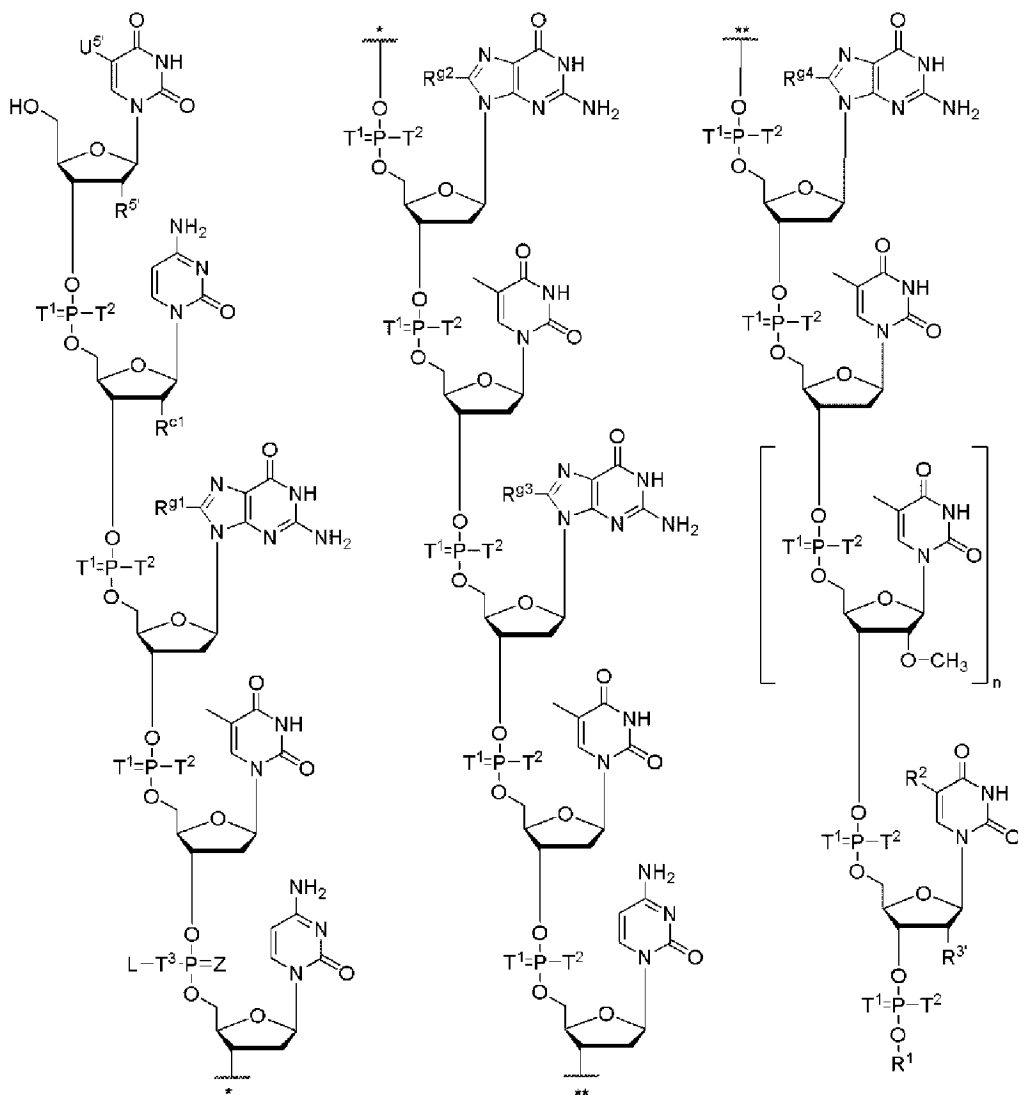




[0250] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (С) можно использовать в качестве предшественников для получения конъюгатов, включающих антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий

фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов формулы (C), связанных через Q-tag, как показано в структурах формулы (A), описанных в настоящей заявке.

[0251] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (C) могут быть модифицированы для присоединения линкерной группы L к концевой группе T<sup>3</sup> в формуле (C) с получением иммуномодулирующих олигонуклеотидов формулы (D). И еще в одном аспекте иммуномодулирующие олигонуклеотиды включает структуру формулы (D)



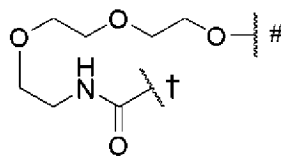
(D),

где

$\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый T<sup>1</sup> независимо представляет собой O или S;

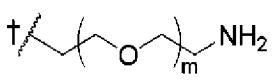
каждый T<sup>2</sup> представляет собой S<sup>-</sup>;



T<sup>3</sup> представляет собой группу

, где  $\sim^{\dagger}$  указывает точку

присоединения к L и где  $\sim \#$  указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

L представляет собой группу , где m представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 50 (например, от около 0 до около 10, от около 0 до около 30, от около 10 до около 30, от около 20 до около 30 и значения в промежутках между ними) и где  $\sim \dagger$  указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида через T<sup>3</sup>;

Z представляет собой O или S;

U<sup>5'</sup> представляет собой -H или галоген;

R<sup>5'</sup> представляет собой -H или метокси;

R<sup>c1</sup> представляет собой -H или метокси;

R<sup>g1</sup>, R<sup>g2</sup>, R<sup>g3</sup> и R<sup>g4</sup> представляют собой H или оксо, необязательно где по меньшей мере один из R<sup>g1</sup>, R<sup>g2</sup>, R<sup>g3</sup> и R<sup>g4</sup> представляет собой оксо, и при этом, когда один из R<sup>g1</sup>, R<sup>g2</sup>, R<sup>g3</sup> и R<sup>g4</sup> представляет собой оксо, тогда углерод, к которому оксо присоединен, содержит простую связь с азотом кольца в 7-положении;

R<sup>3'</sup> представляет собой метокси или 2-метоксиэтокси;

R<sup>1</sup> представляет собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OH;

R<sup>2</sup> представляет собой -H или метил; и

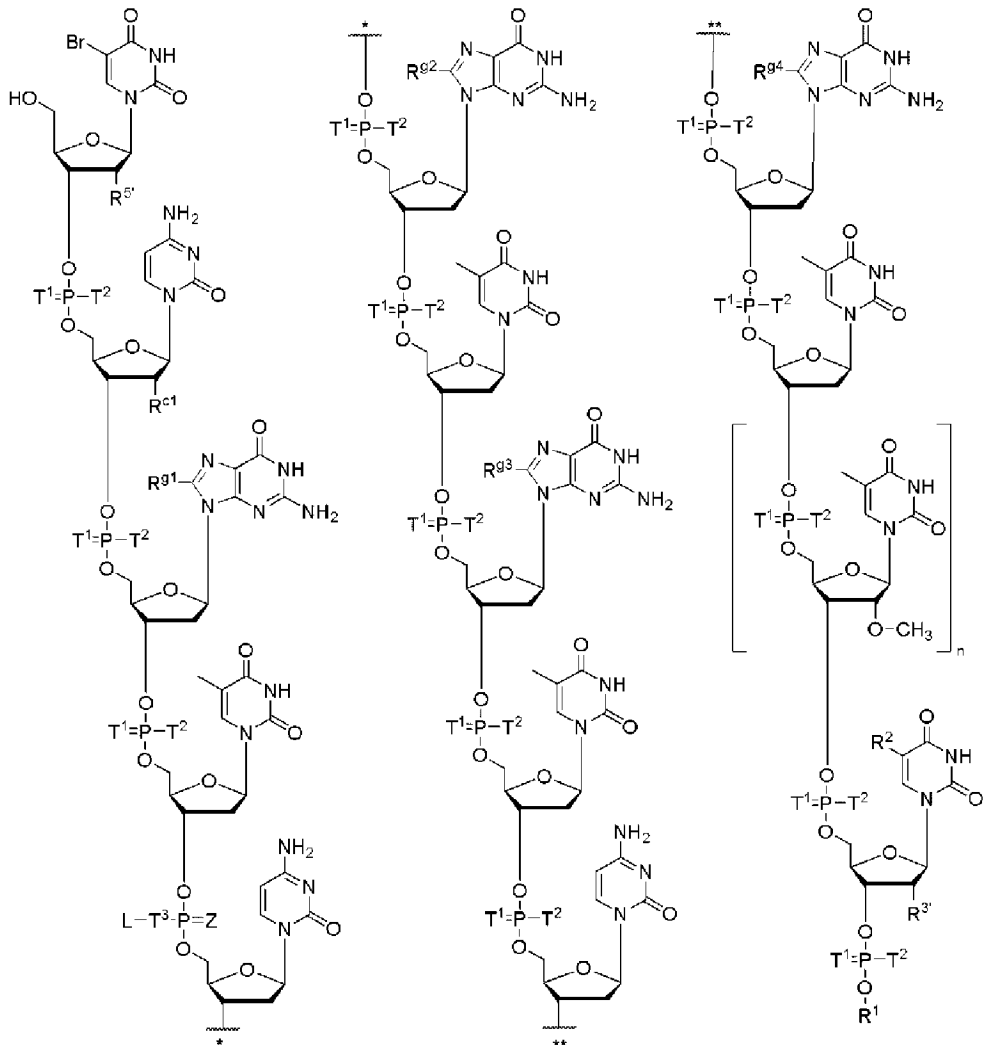
n представляет собой целое число от 0 до 2,

или фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

[0252] В некоторых вариантах осуществления данного аспекта U<sup>5'</sup> представляет собой -H. В других вариантах осуществления U<sup>5'</sup> представляет собой галоген. В некоторых вариантах осуществления U<sup>5'</sup> представляет собой иод или бром. В некоторых вариантах осуществления данного аспекта иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D) представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D'). В других вариантах осуществления данного аспекта иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D) представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D'').

[0253] В некоторых вариантах осуществления данного аспекта иммуномодулирующий олигонуклеотид включает структуру формулы (D')





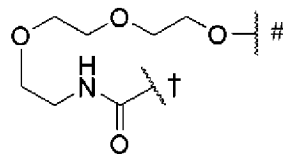
(D'),

где

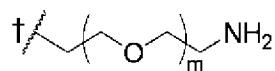
$\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T^2$  представляет собой S<sup>-</sup>;



$T^3$  представляет собой группу  $\text{---}^\dagger$ , где  $\text{---}^\dagger$  указывает точку присоединения к L и где  $\text{---}^\#$  указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;



L представляет собой группу  $\text{---}^\dagger$ , где m представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 50 (например, от около 0 до около 10, от около 0 до около 30, от около 10 до около 30, от около 20 до около 30 и значения в промежутках между ними), и где  $\text{---}^\dagger$  указывает точку присоединения к остальной части

олигонуклеотида через  $T^3$ ;

$Z$  представляет собой  $O$  или  $S$ ;

$R^{5'}$  представляет собой  $-H$  или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой  $-H$  или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой  $H$  или оксо, необязательно где по меньшей мере один из  $R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляет собой оксо, и при этом, когда один из  $R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляет собой оксо, тогда углерод, к которому оксо присоединен, содержит простую связь с азотом кольца в 7-положении;

$R^{3'}$  представляет собой метокси или 2-метоксиэтокси;

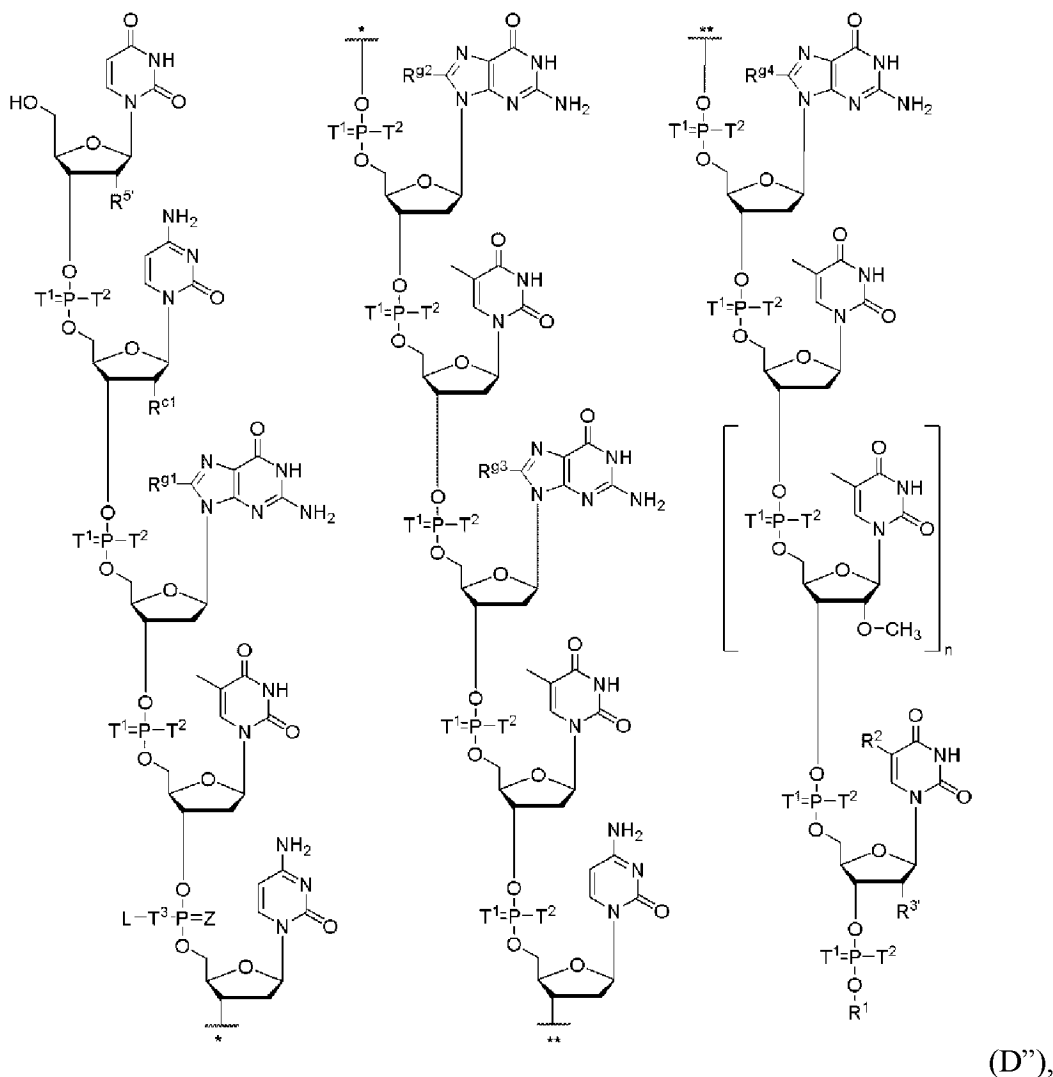
$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

$R^2$  представляет собой  $-H$  или метил; и

$n$  представляет собой целое число от 0 до 2,

или фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

[0254] В других вариантах осуществления данного аспекта иммуномодулирующий олигонуклеотид включает структуру формулы (D'')

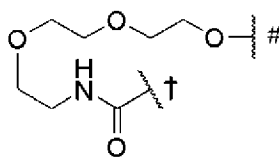


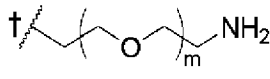


где

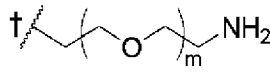

$\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T^2$  представляет собой S<sup>-</sup>;



$T^3$  представляет собой группу , где  указывает точку присоединения к L и где  указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

L представляет собой группу , где m представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 50 (например, от около 0 до около 10, от около 0 до около 30, от около 10 до около 30, от около 20 до около 30 и значения в промежутках между ними), и где  указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида через  $T^3$ ;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой H или оксо, необязательно где по меньшей мере один из  $R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляет собой оксо, и при этом, когда один из  $R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляет собой оксо, тогда углерод, к которому оксо присоединен, содержит простую связь с азотом кольца в 7-положении;

$R^{3'}$  представляет собой метокси или 2-метоксиэтокс;

$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

$R^2$  представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

[0255] В некоторых вариантах осуществления данного аспекта иммуномодулирующий олигонуклеотид включает структуру формулы (D')



олигонуклеотида через  $T^3$ ;

$Z$  представляет собой  $O$  или  $S$ ;

$R^{5'}$  представляет собой  $-H$  или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой  $-H$  или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой  $H$ ;

$R^{3'}$  представляет собой метокси;

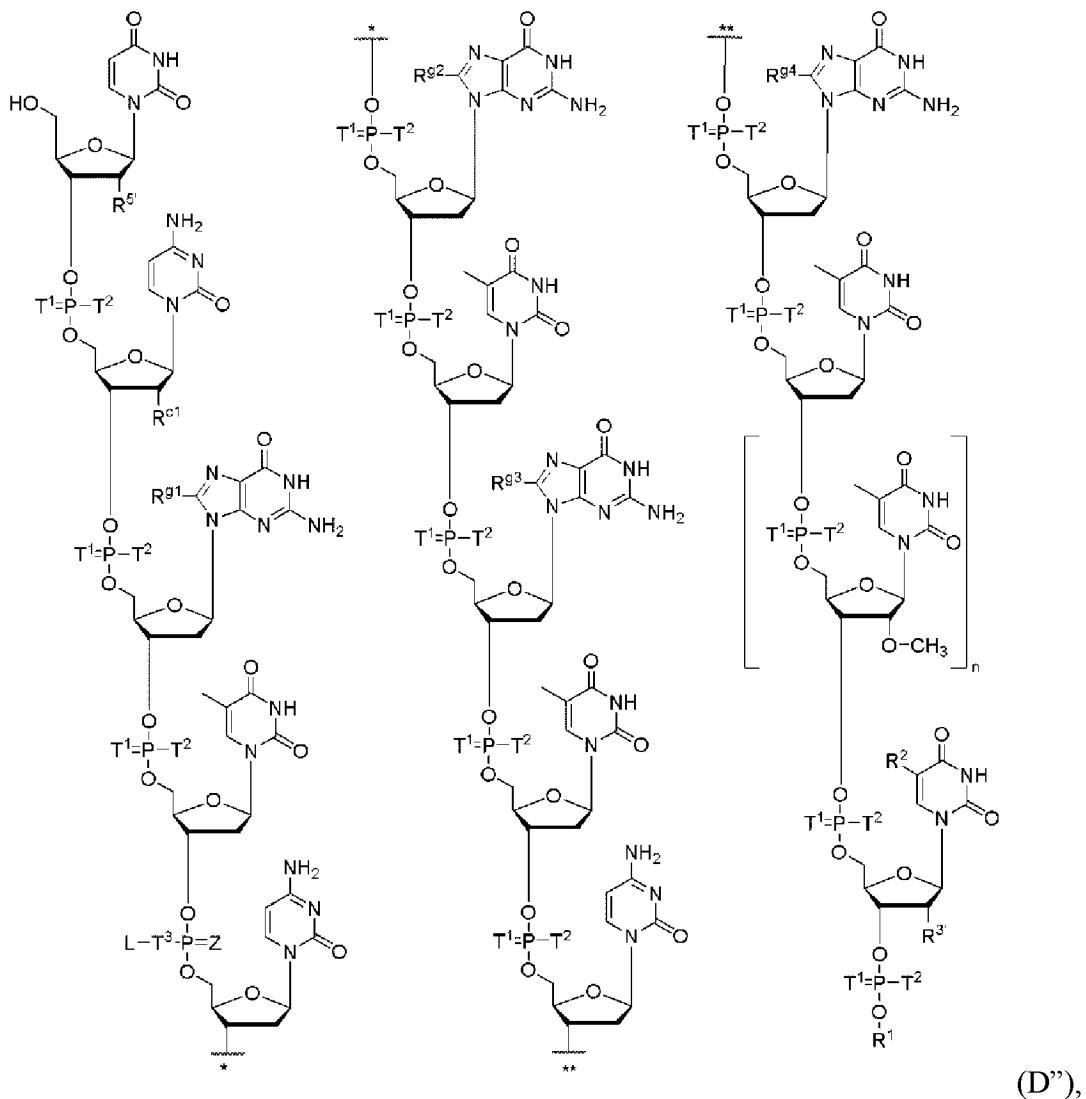
$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

$R^2$  представляет собой  $-H$  или метил; и

$n$  представляет собой целое число от 0 до 2,

или фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

[0256] В других вариантах осуществления данного аспекта иммуномодулирующий олигонуклеотид включает структуру формулы ( $D''$ )

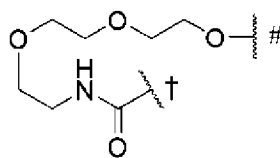


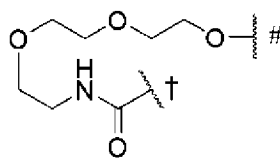


где

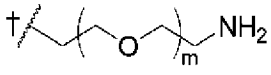

$\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой  $O$  или  $S$ ;

каждый  $T^2$  представляет собой  $S^-$ ;



$T^3$  представляет собой группу , где  указывает точку присоединения к L и где  указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

L представляет собой группу , где m представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 50 (например, от около 0 до около 10, от около 0 до около 30, от около 10 до около 30, от около 20 до около 30 и значения в промежутках между ними), и где  указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида через  $T^3$ ;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой H;

$R^{3'}$  представляет собой метокси;

$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

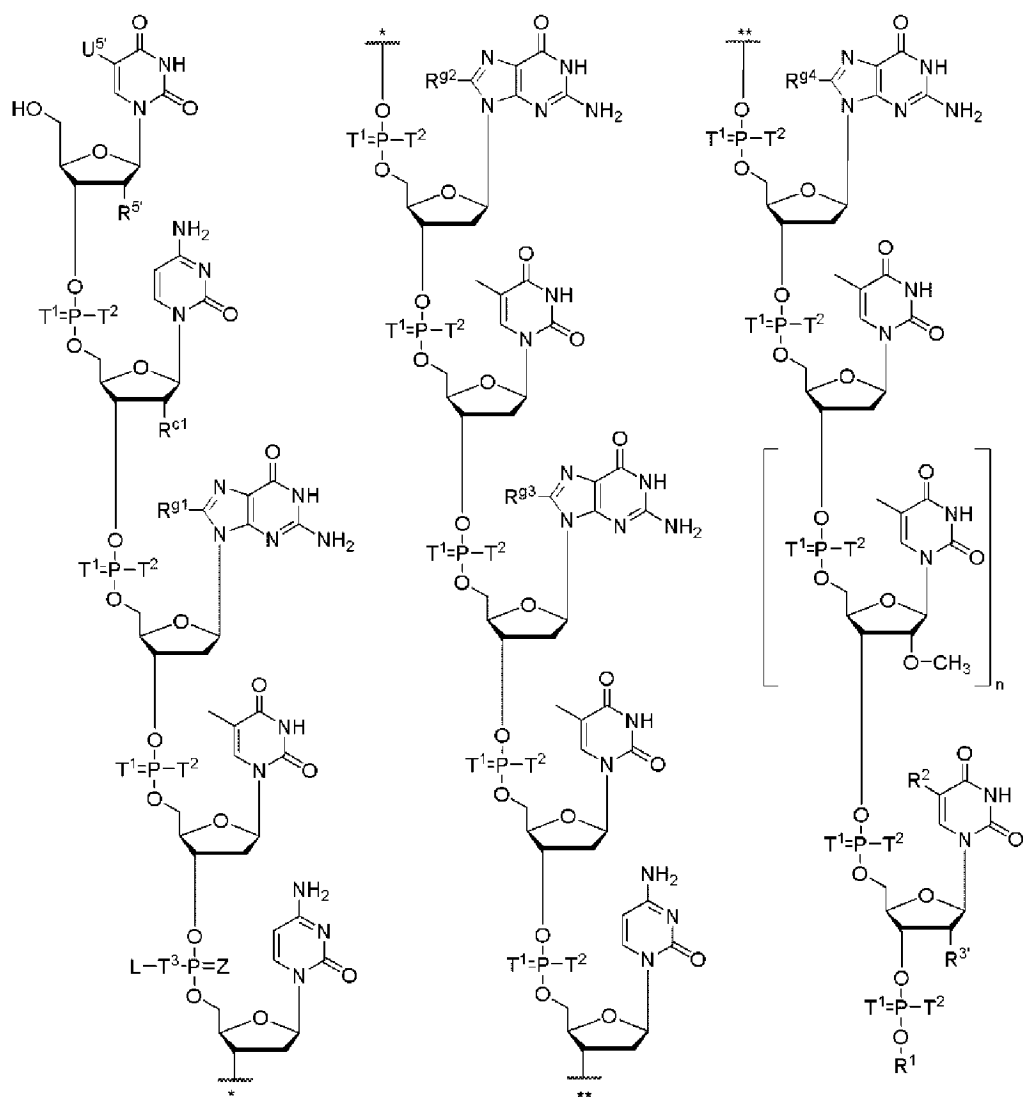
$R^2$  представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

[0257] В некоторых вариантах осуществления данного аспекта Z представляет собой S. В дополнительных вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере одну пару геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S<sup>-</sup>. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S<sup>-</sup>.

[0258] Еще в одном варианте осуществления данного аспекта олигонуклеотид включает структуру формулы (D)



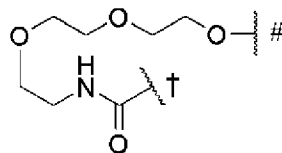
(D),

где  $\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде;

каждый T<sup>1</sup> независимо представляет собой O или S;

каждый T<sup>2</sup> представляет собой S<sup>-</sup>;

при условии, что олигонуклеотид включает по меньшей мере одну пару геминальных T<sup>1</sup> и T<sup>2</sup>, где T<sup>1</sup> представляет собой S и T<sup>2</sup> представляет собой S<sup>-</sup>,



T<sup>3</sup> представляет собой группу  $\sim^\dagger$ , где  $\sim^\dagger$  указывает точку присоединения к L и где  $\sim^\#$  указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

L представляет собой группу  $\sim^\dagger$   $(\text{CH}_2)_m$  NH<sub>2</sub>, где m представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 50 (например, от около 0 до около 10, от около 0

до около 30, от около 10 до около 30, от около 20 до около 30 и значения в промежутках между ними), и где  $\sim$  † указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида через T<sup>3</sup>;

Z представляет собой O или S;  
 U<sup>5'</sup> представляет собой -H или галоген;  
 R<sup>5'</sup> представляет собой -H;  
 R<sup>c1</sup> представляет собой -H;  
 R<sup>g1</sup>, R<sup>g2</sup>, R<sup>g3</sup>, и R<sup>g4</sup> представляют собой H;  
 R<sup>3'</sup> представляет собой метокси;  
 R<sup>1</sup> представляет собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OH;  
 R<sup>2</sup> представляет собой -метил; и

n имеет значение 1,

или фармацевтически приемлемую соль такого соединения.

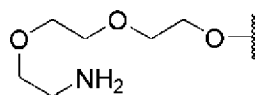
[0259] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных выше по меньшей мере одна пара геминальных T<sup>1</sup> и T<sup>2</sup>, где T<sup>1</sup> представляет собой S и T<sup>2</sup> представляет собой S, находится между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11. В других вариантах осуществления вышеизложенного олигонуклеотид включает по меньшей мере две пары геминальных T<sup>1</sup> и T<sup>2</sup>, где T<sup>1</sup> представляет собой S и T<sup>2</sup> представляет собой S, и где по меньшей мере две пары геминальных T<sup>1</sup> и T<sup>2</sup>, где T<sup>1</sup> представляет собой S и T<sup>2</sup> представляет собой S, находятся между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11.

[0260] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает одну или две пары геминальных T<sup>1</sup> и T<sup>2</sup>, где T<sup>1</sup> представляет собой S и T<sup>2</sup> представляет собой S, и где одна или две пары геминальных T<sup>1</sup> и T<sup>2</sup> находятся между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает одну пару геминальных T<sup>1</sup> и T<sup>2</sup>, где T<sup>1</sup> представляет собой S и T<sup>2</sup> представляет собой S, и где пара геминальных T<sup>1</sup> и T<sup>2</sup> находится между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11. В некоторых других вариантах осуществления

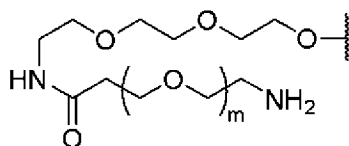


олигонуклеотид включает две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, и где две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находятся между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11.

[0261] В некоторых вариантах осуществления  $R^{5'}$  представляет собой H. В других вариантах осуществления  $R^{5'}$  представляет собой метокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^{c1}$  представляет собой H. В других вариантах осуществления  $R^{c1}$  представляет собой метокси. В некоторых других вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой метил. В некоторых других вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой H. В дополнительных вариантах осуществления, которые можно комбинировать с любыми из описанных выше вариантов осуществления,  $T^3$  представляет собой



. В некоторых других вариантах осуществления  $T^3$  представляет



собой

. В некоторых вариантах осуществления  $m$  представляет собой целое число от 20 до 25 (например, любое из 20, 21, 22, 23, 24 и 25).

[0262] В другом аспекте иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D) представляет собой олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов Таблицы 5 и Таблицы 6, или его фармацевтически приемлемую соль. В других вариантах осуществления данного аспекта олигонуклеотид формулы (D) выбран из группы, состоящей из олигонуклеотидов Таблицы 6 или их фармацевтически приемлемых солей.





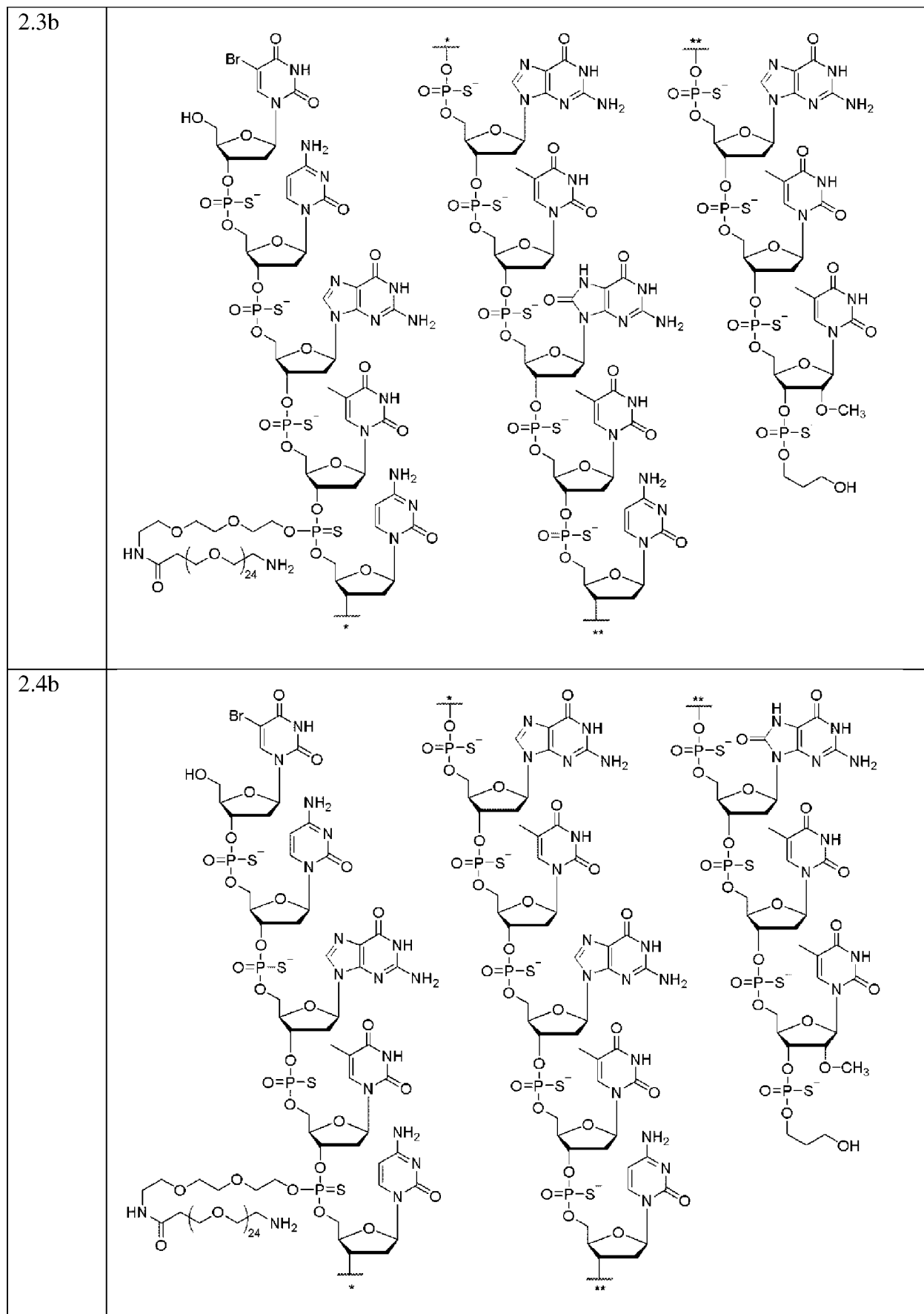


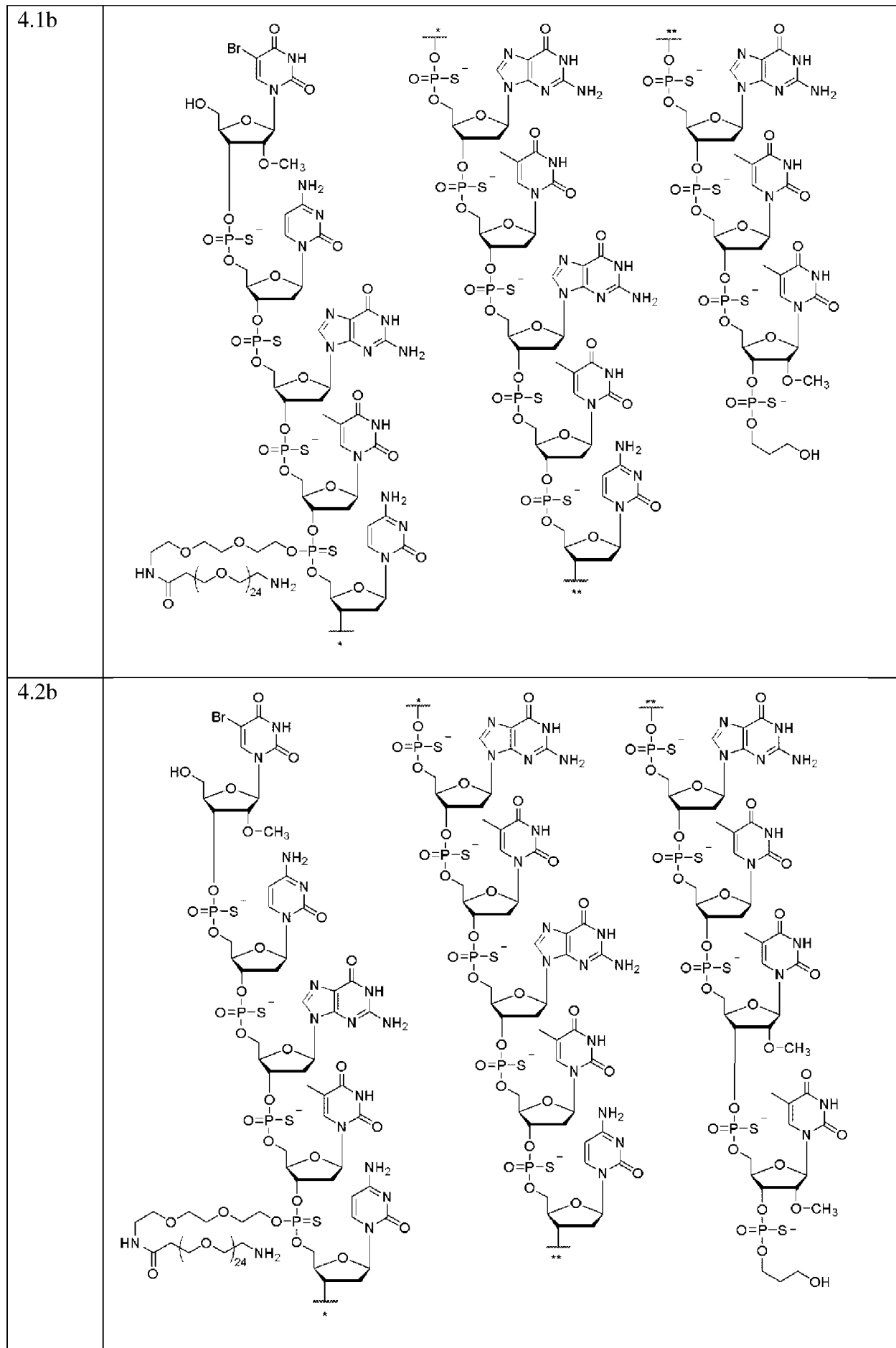
Таблица 6

Структуры модифицированных олигонуклеотидов (с -PEG<sub>3</sub>NHCOPEG<sub>24</sub>NH<sub>2</sub>)

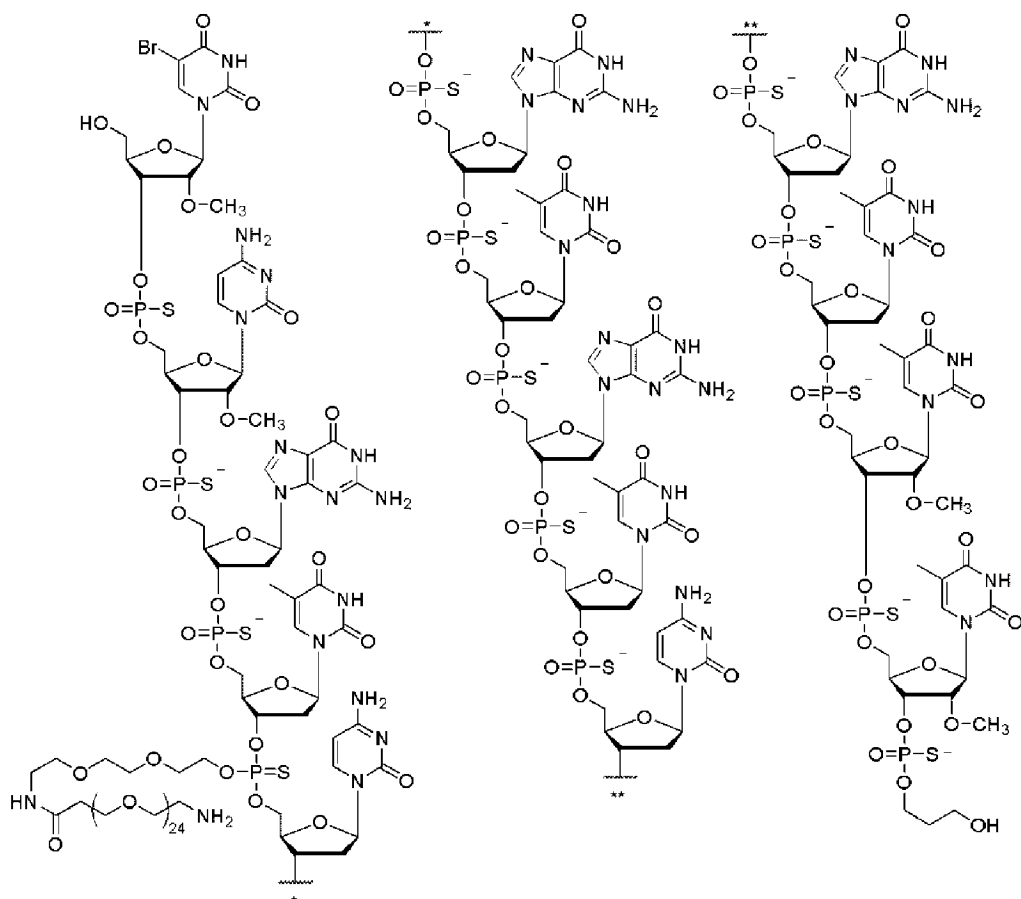
| Соед. | Структура |
|-------|-----------|
|-------|-----------|

| №    |  |
|------|--|
| 3.1b |  |
| 3.2b |  |

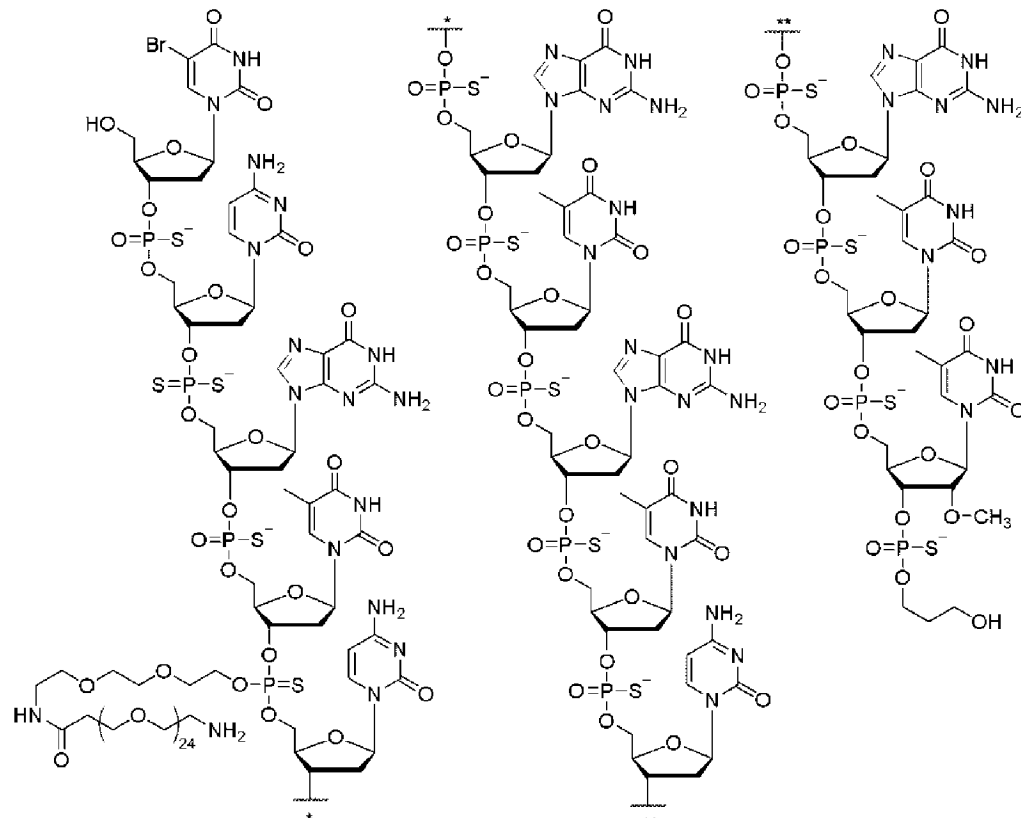




4.3b



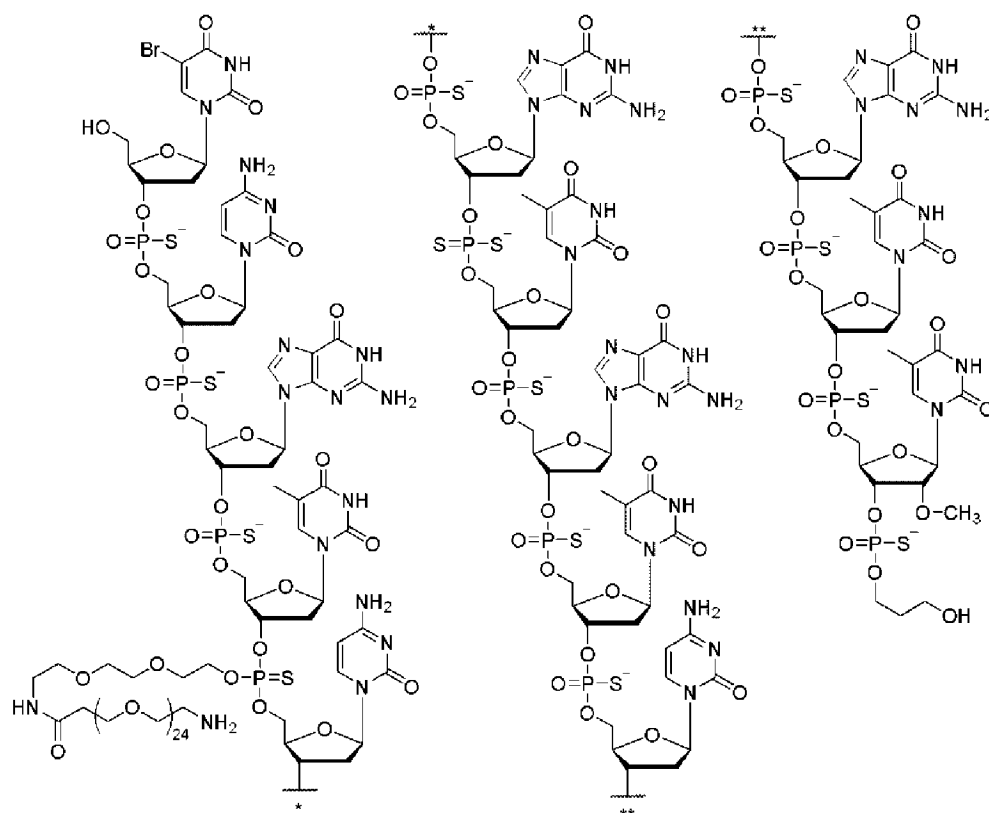
5.1b



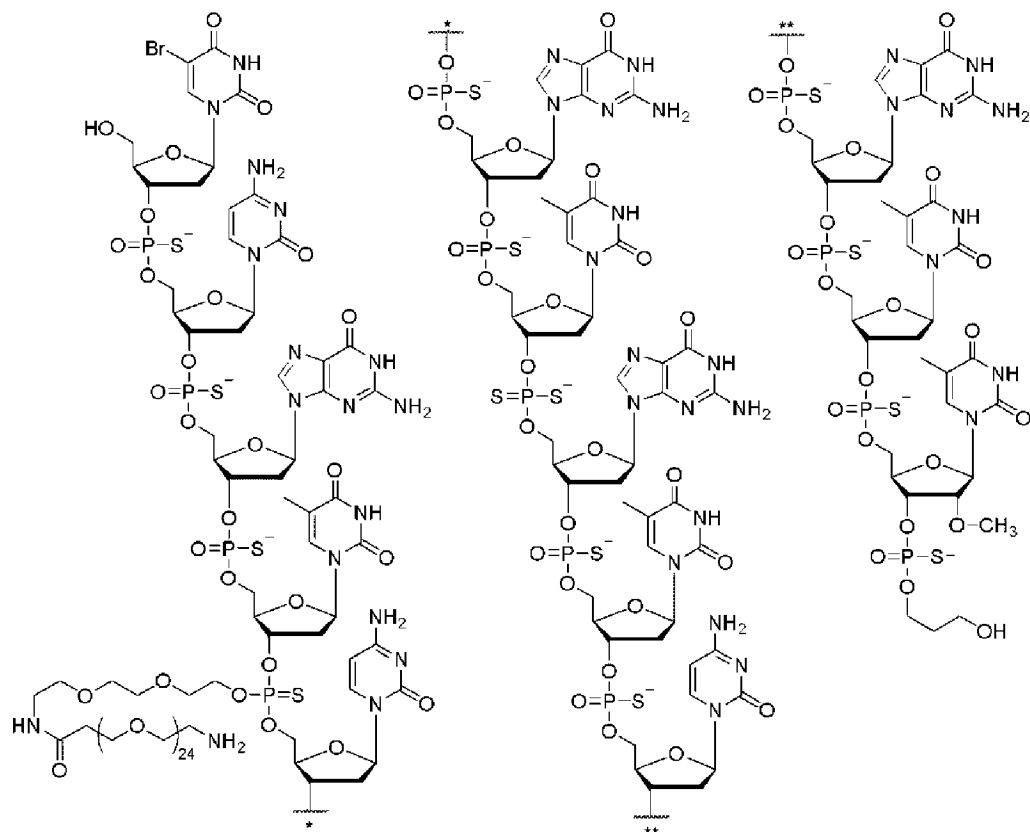




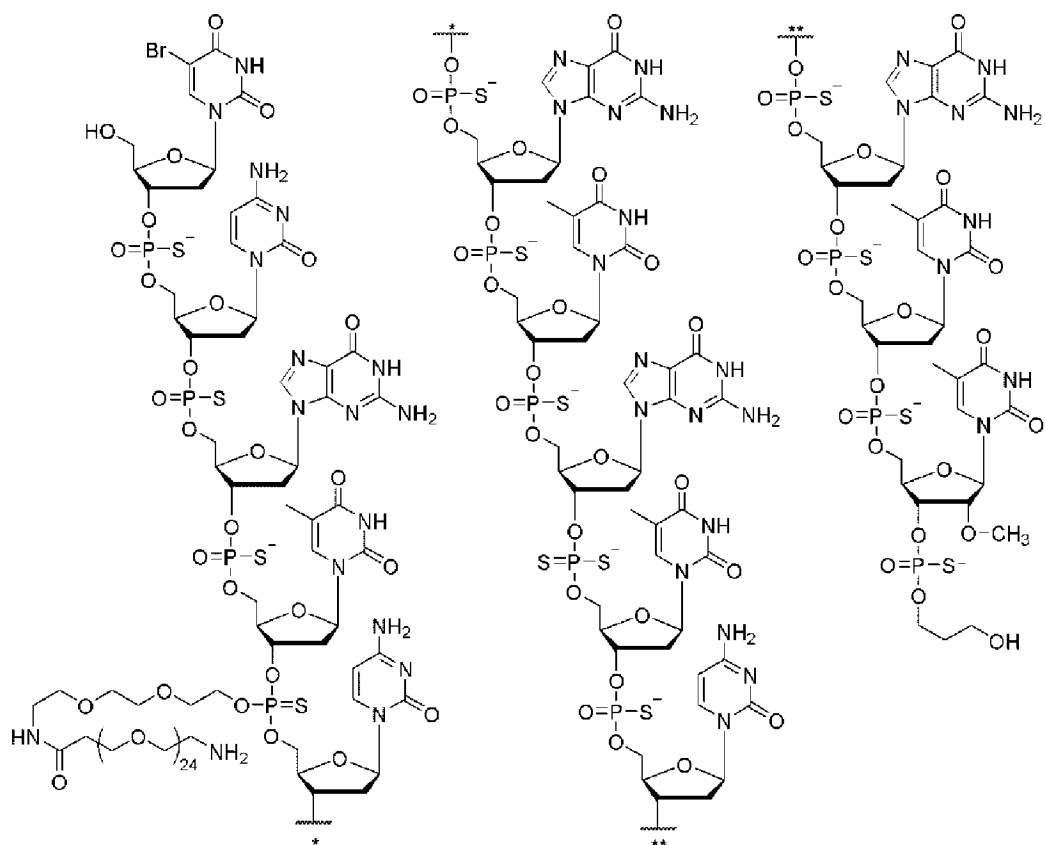
5.4b



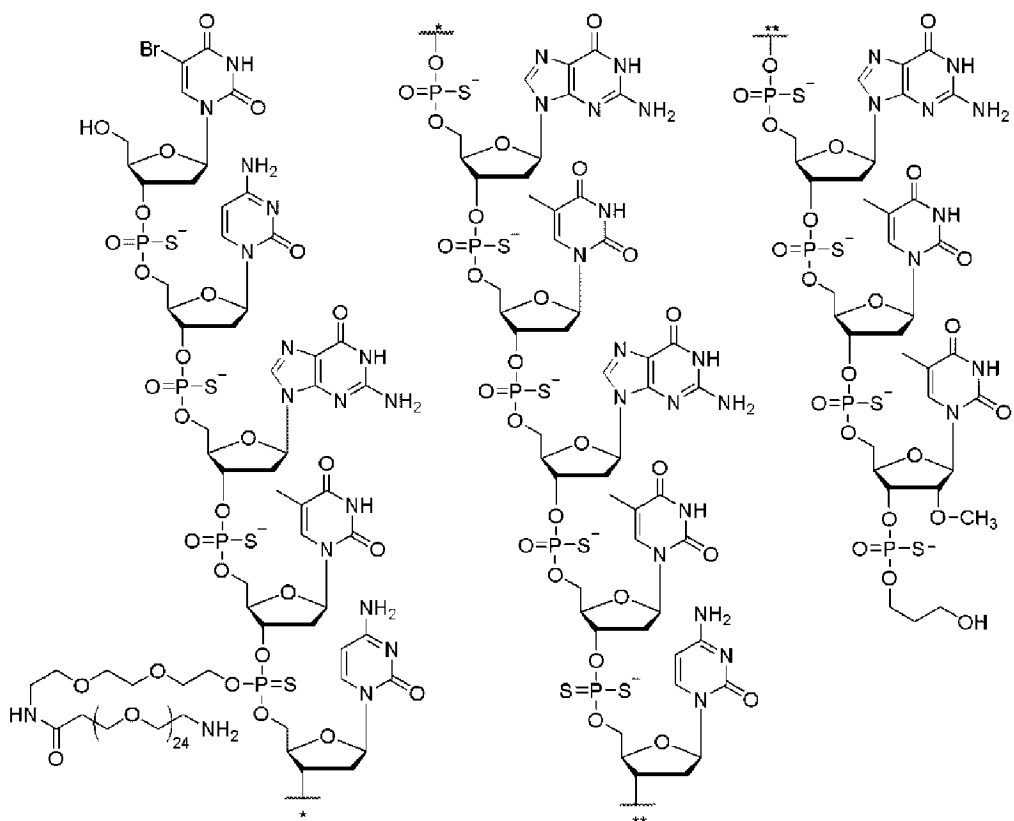
5.5b



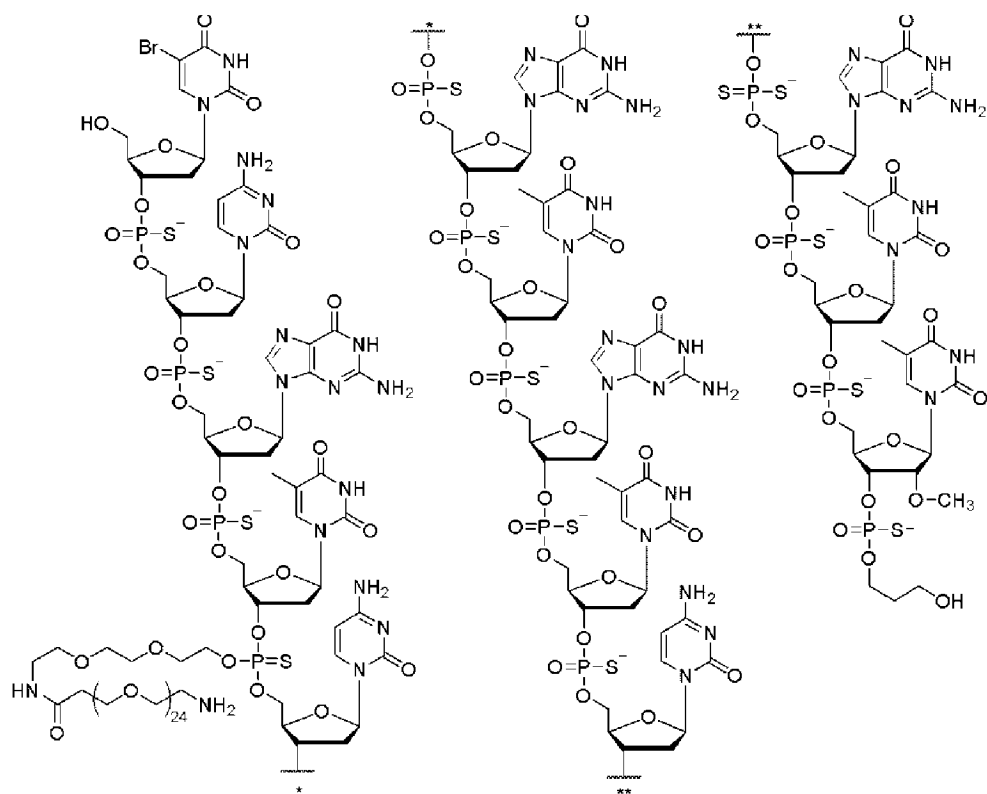
5.6b



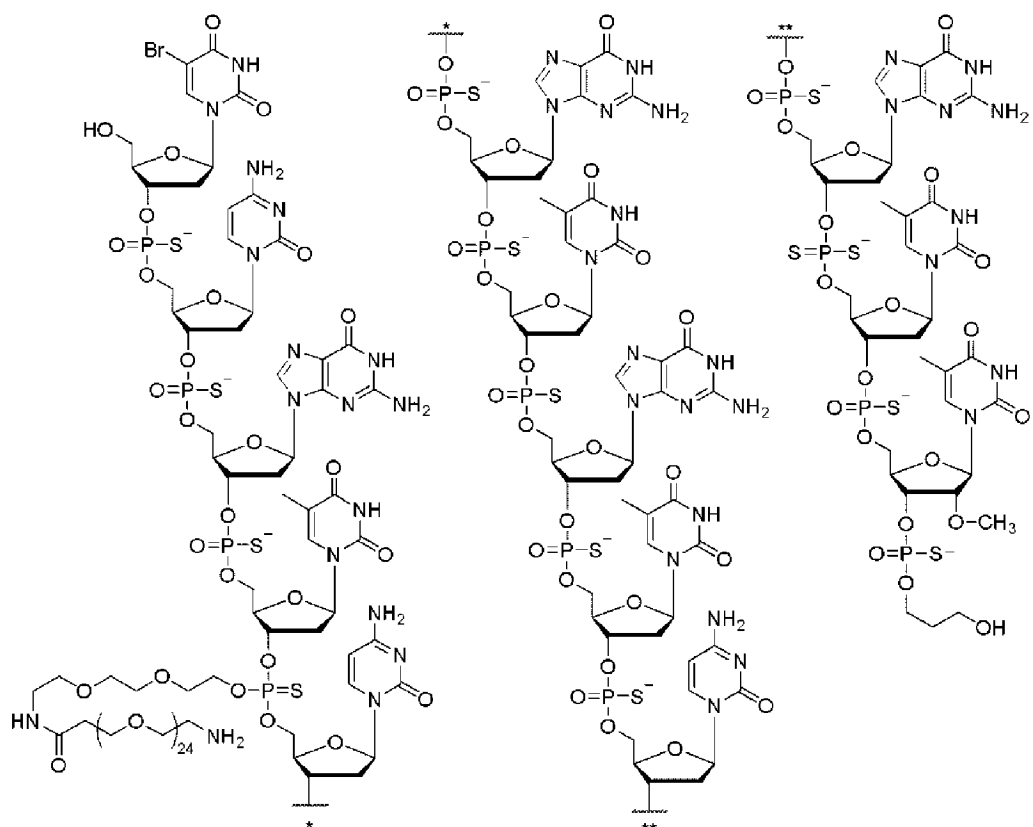
5.7b



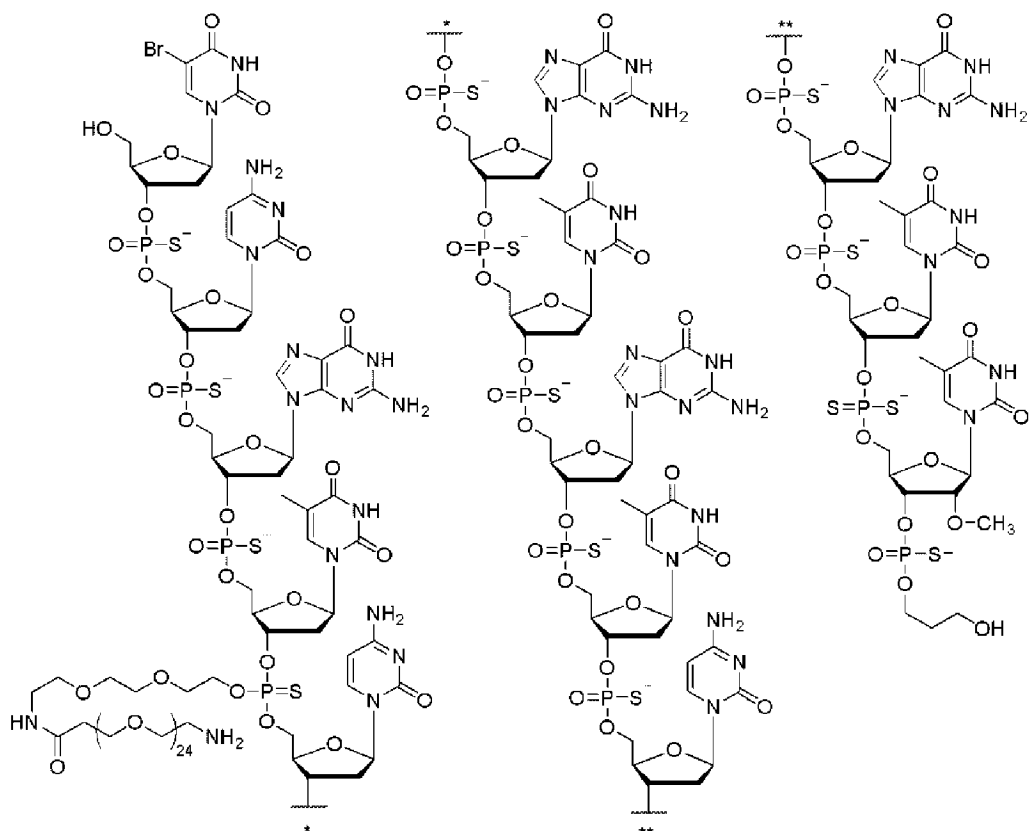
5.8b



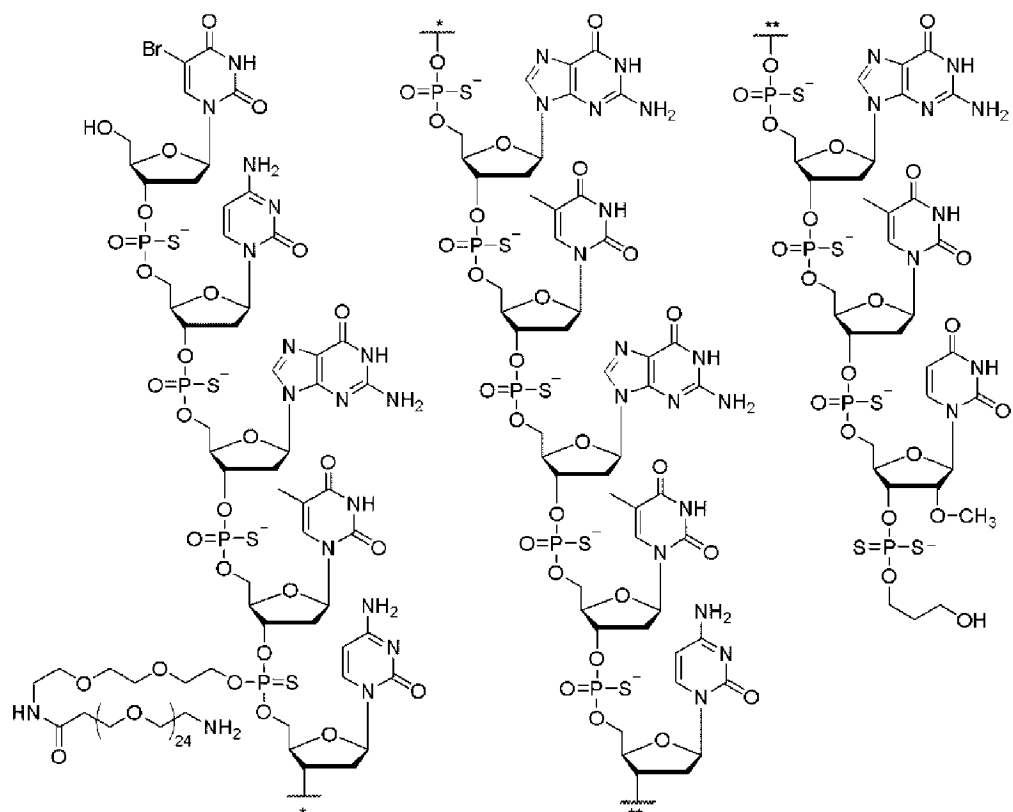
5.9b



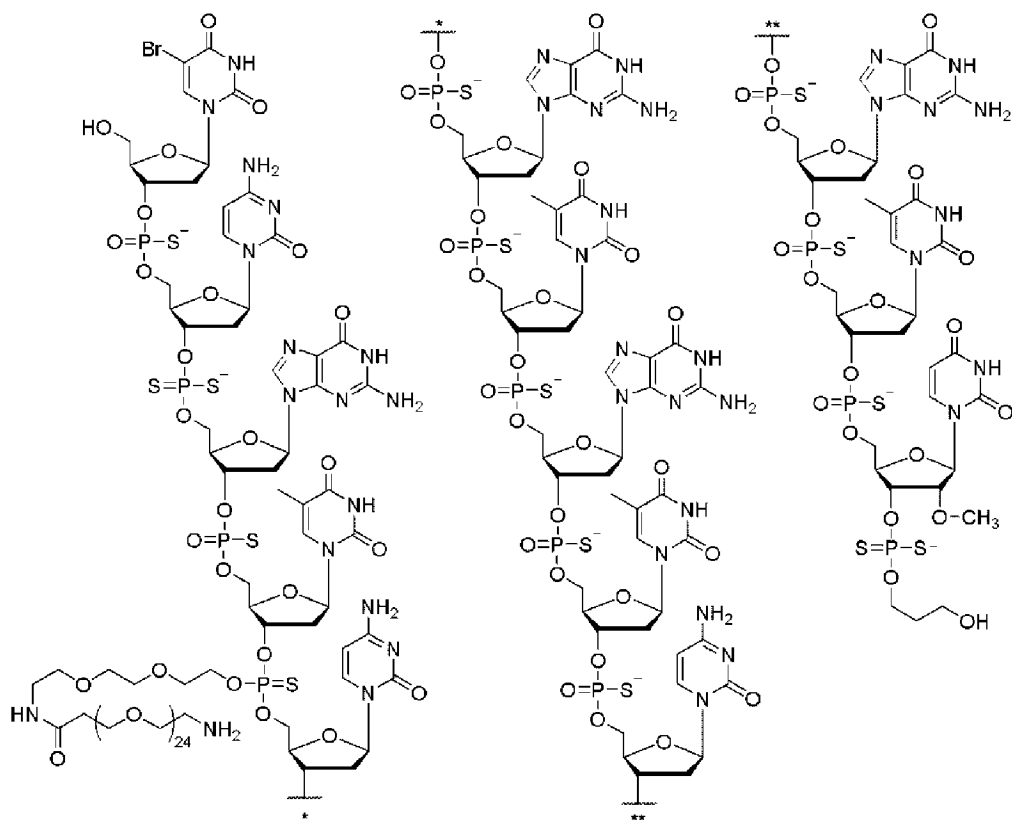
5.10b



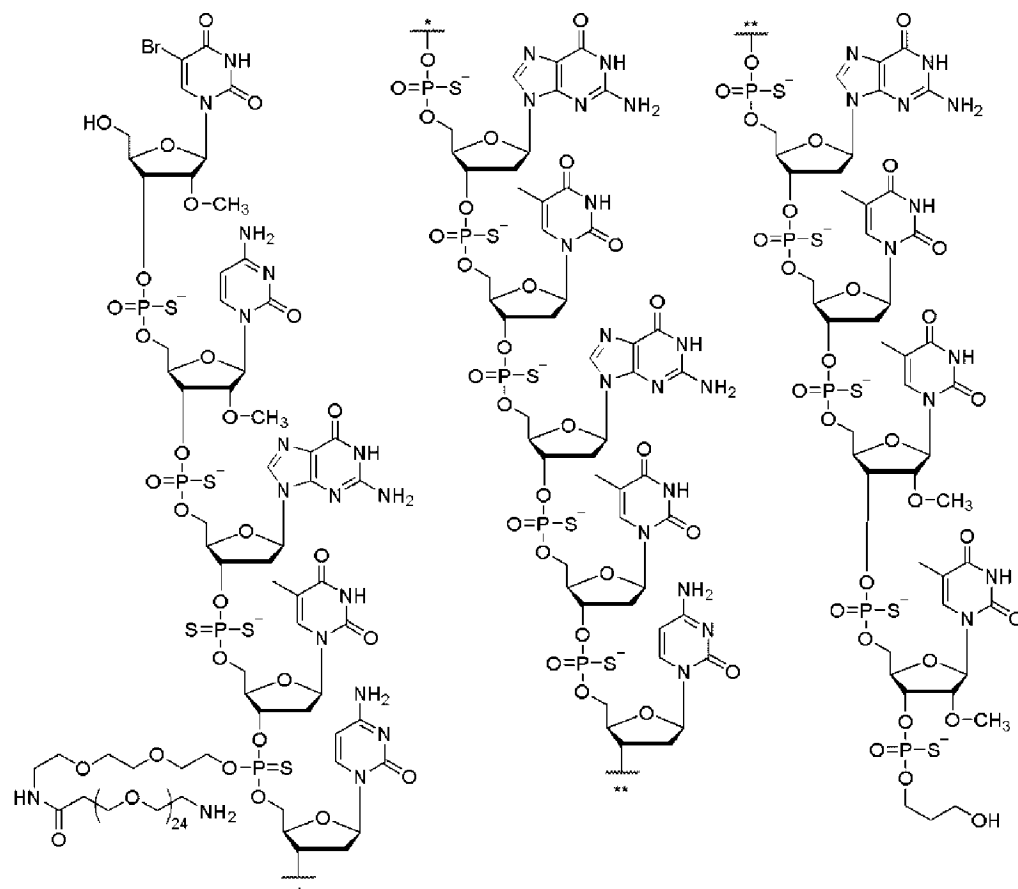
5.11b



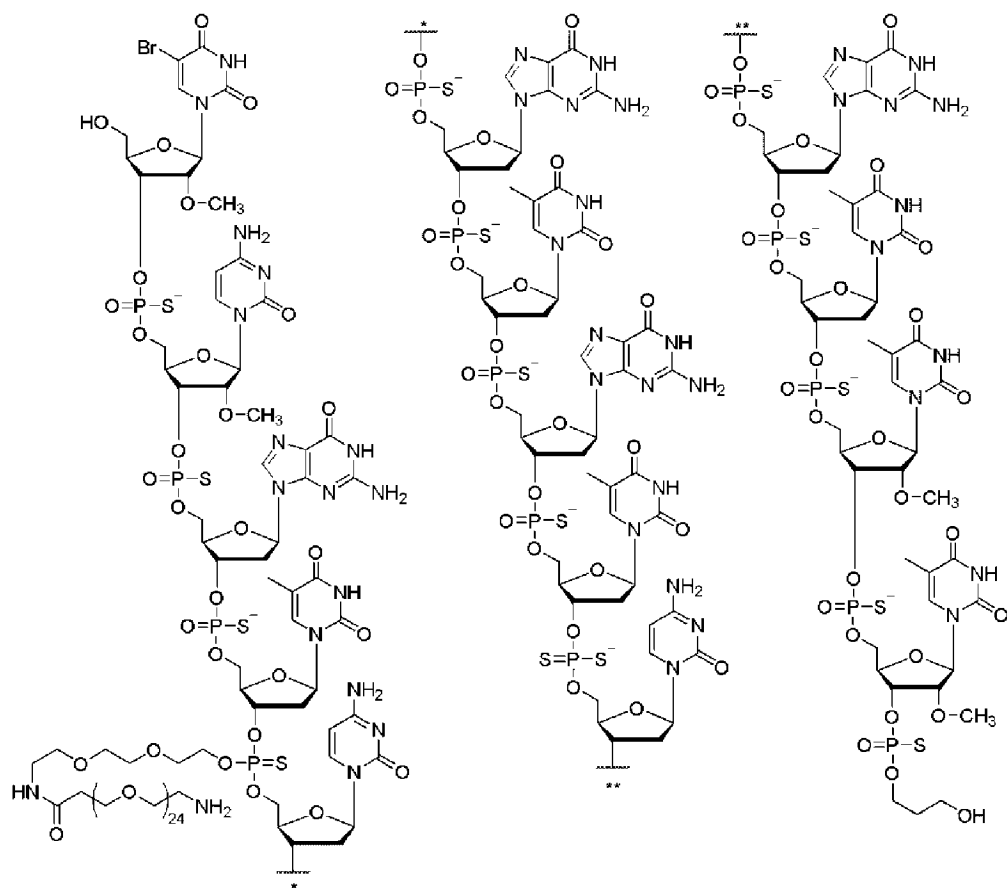
5.12b



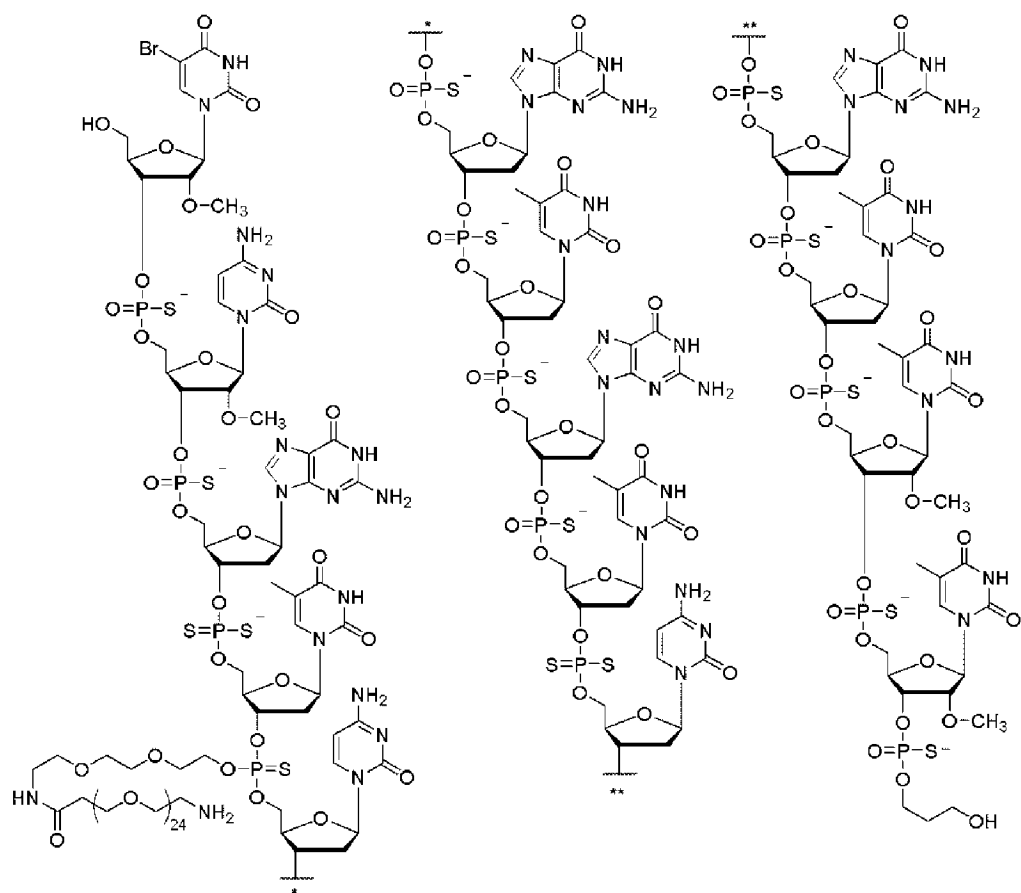
6.1b



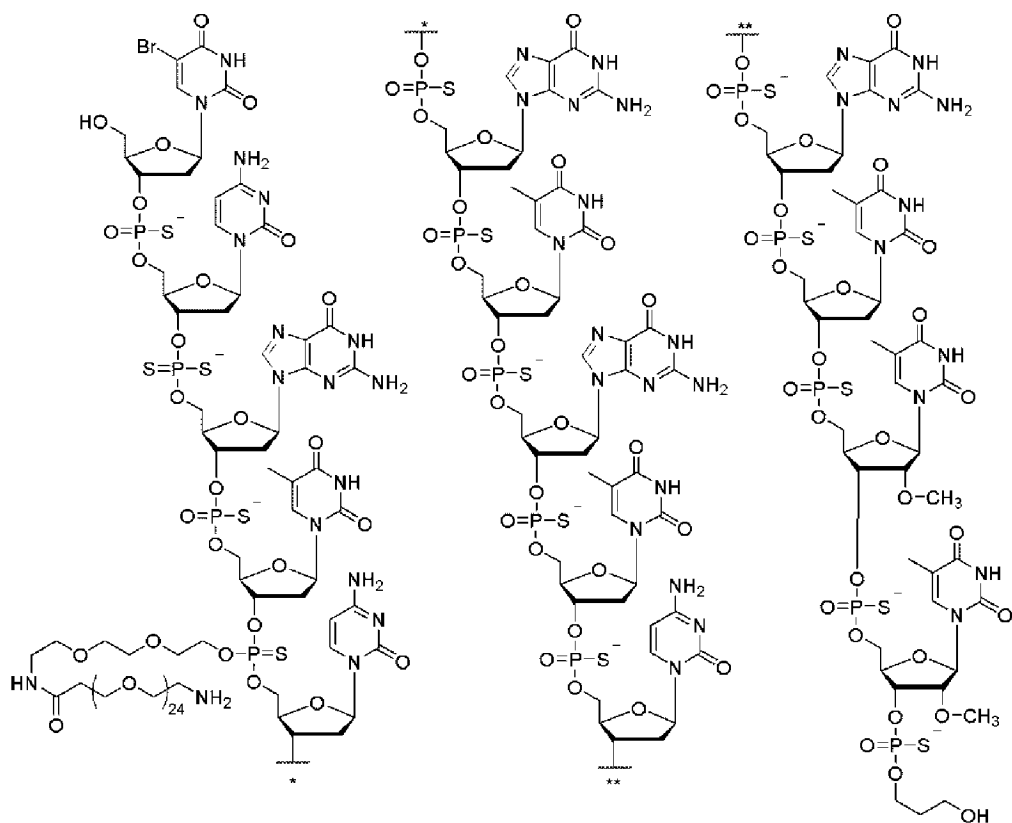
6.2b



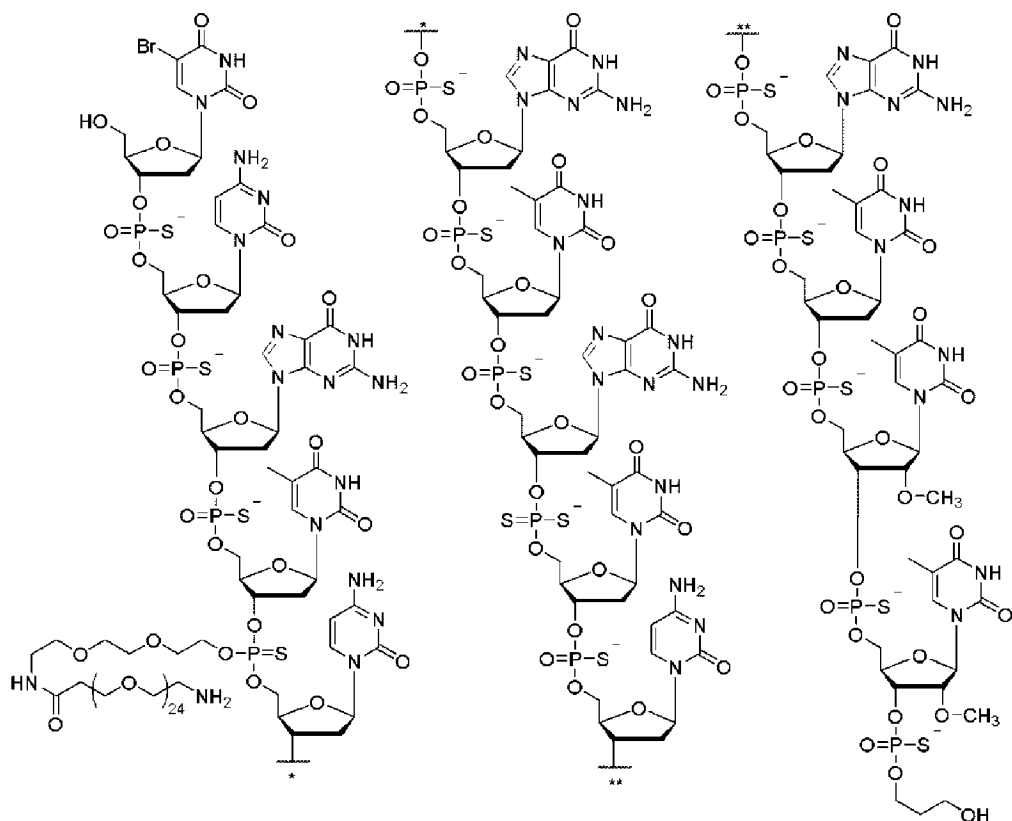
6.3b



7.1b



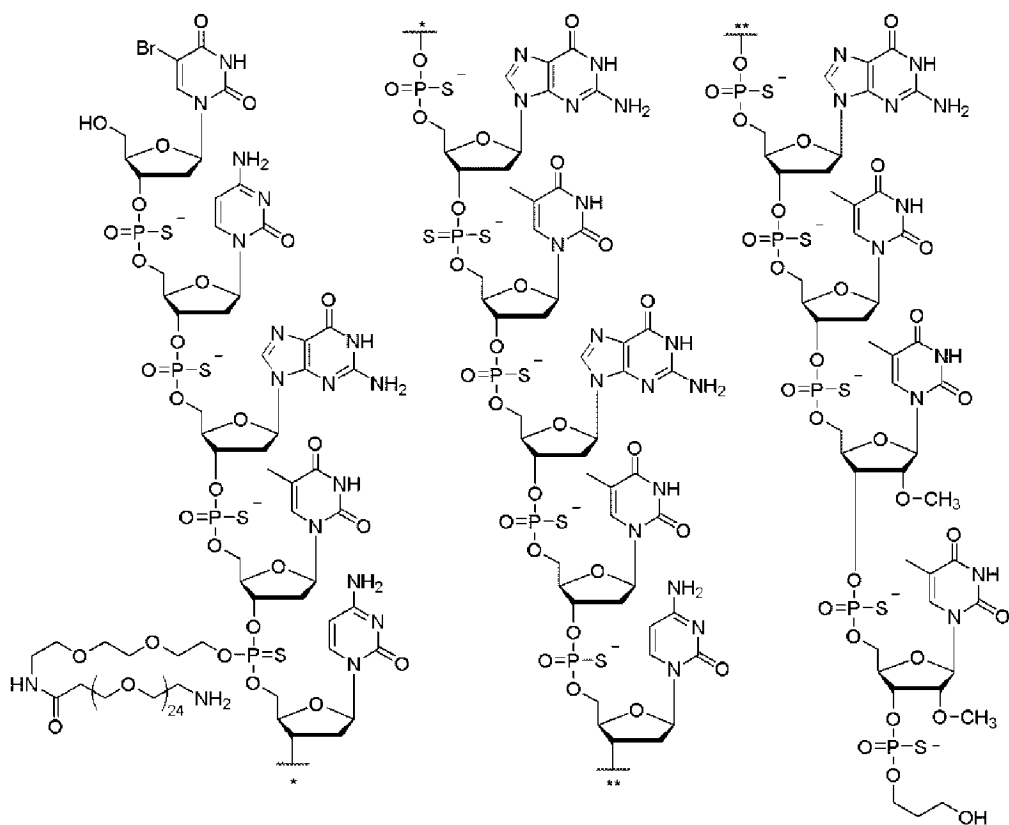
7.2b



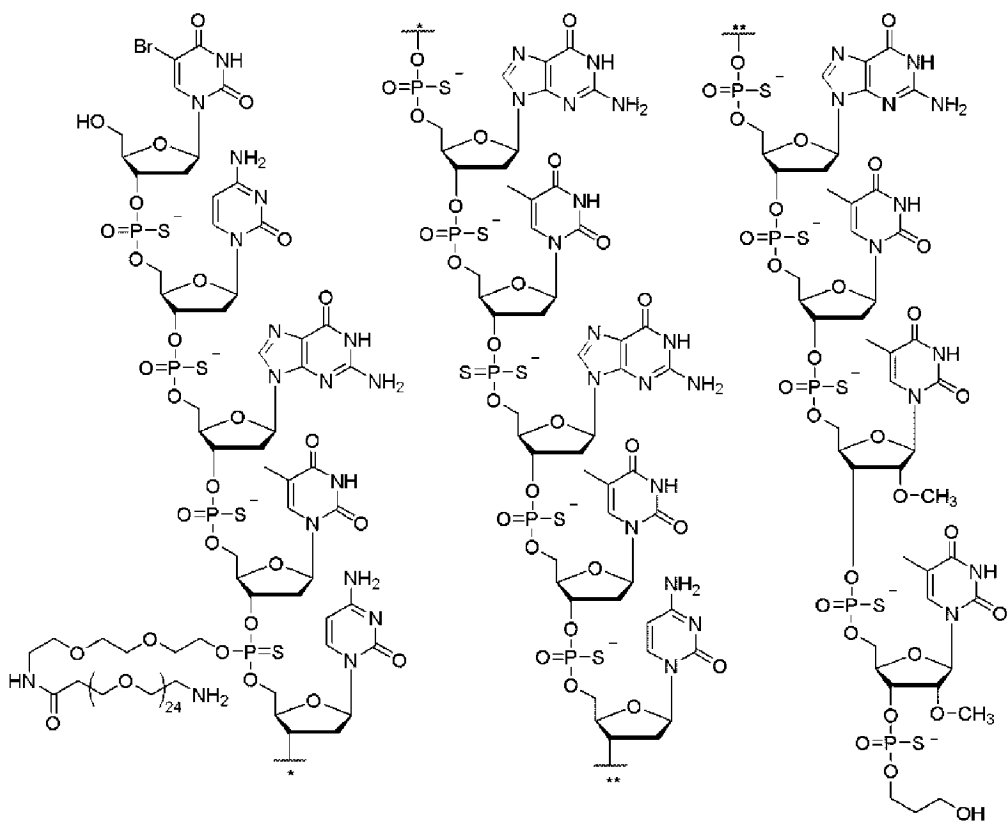




7.5b



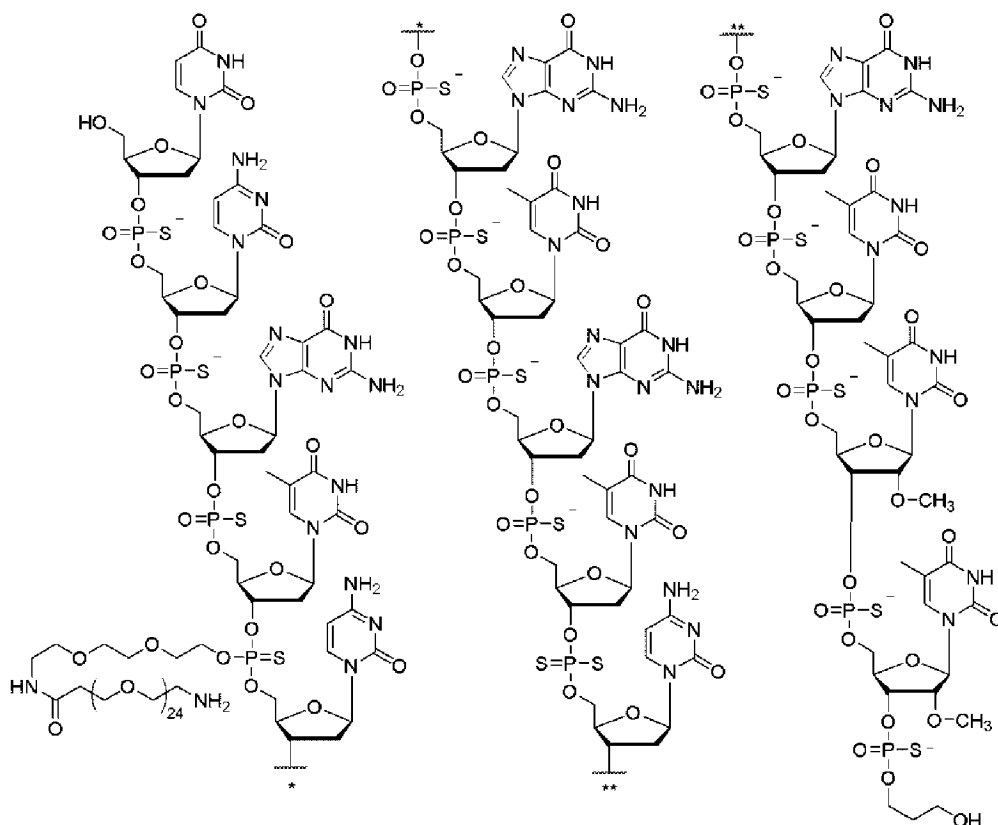
7.6b







15.7b



[0263] Как и в случае с олигонуклеотидами формулы (С), иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (D) можно использовать в качестве предшественников для получения конъюгатов, включающих антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов формулы (D), связанных через Q-tag, как показано в структурах формулы (A), описанной в настоящей заявке.

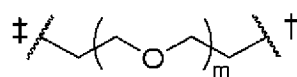
[0264] Иммуномодулирующие олигонуклеотиды формул (С) и (D), описанных в настоящей заявке, можно получить в соответствии со способами, известными из уровня техники. Общий способ для получения иммуномодулирующих олигонуклеотидов, включая те, которые представлены в настоящее изобретение, описан в разделе, озаглавленном “общий синтез онуклеотидов”, настоящего раскрытия.

### II.B. СВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ

[0265] В другом аспекте олигонуклеотид конъюгирован с антителом к нектину-4 через связывающий фрагмент. Длина, жесткость и химическая композиция связывающего фрагмента влияют на скорость реакции конъюгации и стабильность получаемых конъюгатов. В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент включает полиэтиленгликоль (PEG). В некоторых вариантах осуществления PEG содержит около 10-50 этиленгликолевых звеньев. В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент представляет собой алифатическую цепь.

[0266] Для формулы (A) связывающий фрагмент представлен как L. В некоторых вариантах осуществления линкер L включает олигоэтиленгликолевый или полиэтиленгликолевый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления линкер L

представляет собой группу, включающую структуру



, где  $\sim \dagger$  указывает точку присоединения к  $Y^{PTE}$ , а  $\sim \ddagger$  указывает точку присоединения к остальной части конъюгата.

[0267] В других вариантах осуществления линкер L представляет собой группу,

включающую структуру , где  $\sim \dagger$  указывает точку присоединения к  $Y^{PTE}$ , а  $\sim \ddagger$  указывает точку присоединения к остальной части конъюгата.

В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  отсутствует. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  представляет собой незамещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  независимо представляет собой незамещенный  $C_{1-6}$  алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^1$  представляет собой метил или этил. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  независимо представляет собой замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  независимо представляет собой замещенный  $C_{1-6}$  алкил. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкил, замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкокси, ацила, ацилокси, алкоксикарбонила, карбонилалкокси, ациламино, амино, аминацила, аминокарбониламино, аминокарбониллокси, циклоалкила, циклоалкенила, циано, азидо, галогена, гидроксила, нитро, карбоксила, тиола, тиаалкила, алкила, алкенила, алкинила, гетероциклила, аминосульфонила, сульфоамино, сульфонила и оксо.

[0268] В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  отсутствует. В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  представляет собой незамещенный или замещенный алкил.

[0269] В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  отсутствует. В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  представляет собой линкерную группу. В некоторых вариантах осуществления линкерная группа представляет собой незамещенный или замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления линкерная группа независимо представляет собой незамещенный  $C_{1-6}$  алкил. В некоторых вариантах осуществления линкерная группа представляет собой метил или этил. В некоторых вариантах осуществления линкерная группа независимо представляет собой замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления линкерная группа независимо представляет собой замещенный  $C_{1-6}$  алкил. В некоторых вариантах осуществления линкерная группа представляет собой  $C_{1-6}$  алкил, замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкокси, ацила, ацилокси, алкоксикарбонила, карбонилалкокси, ациламино, амино, аминацила, аминокарбониламино, аминокарбониллокси, циклоалкила, циклоалкенила, циано, азидо, галогена, гидроксила,

нитро, карбоксила, тиола, тиоалкила, алкила, алкенила, алкинила, гетероциклила, аминосульфонила, сульфониламино, сульфонила и оксо. В некоторых вариантах осуществления линкерная группа представляет собой аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления аминокислота выбрана из группы, состоящей из глицина, аланина, глутаминовой кислоты и пролина. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой метил. В некоторых вариантах осуществления линкерная группа представляет собой  $-R^5C(O)R^6NHR^7-$ , где  $R^5$  и  $R^7$  независимо отсутствуют или представляют собой незамещенный или замещенный алкил и  $R^6$  представляет собой аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления аминокислота выбрана из группы, состоящей из глицина, аланина, глутаминовой кислоты и пролина. В некоторых вариантах осуществления линкерная группа представляет собой  $-R^3C(O)NHR^4-$ , где  $R^3$  и  $R^4$  независимо отсутствуют или представляют собой незамещенный или замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой метилен и  $R^4$  представляет собой  $-(CH_2)_4-$ . В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой метилен и  $R^4$  отсутствует. В случае более одного олигонуклеотида (*m.e.*  $p=2$ ) два  $L^1$  могут быть разными или одинаковыми, два  $L^2$  могут быть разными или одинаковыми и два  $L^3$  могут быть разными или одинаковыми.

[0270] В некоторых вариантах осуществления  $m$  имеет значение около 3-10, около 10-15, около 15-20, около 20-25, около 25-30, около 5-16, около 15-30, около 15-25 или около 20-30. В некоторых вариантах осуществления  $m$  имеет значение 20, 21, 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления  $m$  имеет значение около 24.

[0271] В любом из описанных вариантов осуществления линкер может представлять собой расщепляемый линкер. В любом из описанных вариантов осуществления линкер может представлять собой нерасщепляемый линкер.

### III. АНТИТЕЛА К НЕКТИНУ-4

[0272] В настоящей заявке, в различных вариантах осуществления, описаны антитела, которые специфически связывают нектин-4 (т.е. антитела против нектина-4, антитела к нектину-4, антитела, нацеленные на нектин-4), в частности антитела, которые специфически связывают нектин-4 человека, и их конъюгаты. В некоторых вариантах осуществления нектин-4 относится к нектину-4 человека, и антитела специфически связывают нектин-4 человека. Ген нектина-4 и полипептидные последовательности (например, человеческий ген и полипептидные последовательности) известны из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 специфически связывается с внеклеточным доменом полипептида нектина-4, например полипептида нектина-4 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 специфически связывается с IgV доменом полипептида нектина-4, например полипептида нектина-4 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 специфически связывается с внеклеточным доменом, который не является IgV доменом полипептида нектина-4, например полипептида нектина-4 человека. В некоторых вариантах осуществления конъюгат нектина-4 (т.е. конъюгат против нектина-4)

специфически связывается с клеткой (например, опухолевой клеткой), которая экспрессирует полипептид нектин-4, например полипептид нектин-4 человека, на клеточной поверхности.

[0273] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид конъюгирован с антителом к нектину-4 через один или несколько Q-tag. В некоторых вариантах осуществления Q-tag включает глутаминовый остаток, который связан с остальной частью конъюгата. В других вариантах осуществления данного аспекта, которые можно комбинировать с любыми из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, каждый Q-tag независимо включает или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-55. В некоторых вариантах осуществления каждый Q-tag независимо включает или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из пептидных последовательностей Таблицы 16. В других вариантах осуществления данного аспекта каждый Q-tag независимо включает или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40-55. В других вариантах осуществления каждый Q-tag независимо включает или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47-49. В некоторых вариантах осуществления Q-tag включает LLQGG (SEQ ID NO:172), GGGLLQGG (SEQ ID NO:173), RPQGF (SEQ ID NO:47) или RPQGFQPP (SEQ ID NO:49). В некоторых вариантах осуществления Q-tag включает пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47). В некоторых вариантах осуществления Q-tag, включающий пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), выбран из группы, состоящей из RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQGFQPP (SEQ ID NO:48) и RPQGFQPP (SEQ ID NO:49).

[0274] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 выбрано из группы, состоящей из поликлонального антитела, моноклонального антитела, гуманизированного антитела, человеческого антитела, химерного антитела и фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела к нектину-4 выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv фрагментов, scFv, однодоменного антитела, антитела, содержащего только одну тяжелую цепь, и антитела, содержащего только одну легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 представляет собой биспецифическое антитело (т.е. специфически связывается с нектином-4 человека и специфически связывается с другой мишенью, отличной от нектин-4 человека). В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 является мультиспецифическим (т.е. специфически связывается с нектином-4 человека и специфически связывается с по меньшей мере двумя другими мишенями, отличными от нектин-4 человека).

[0275] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен антитела, обозначенного как TNT-201, TNT-202, TNT-203, TNT-204, TNT-205, TNT-206, TNT-207, TNT-208, TNT-209, TNT-210, TNT-211, TNT-212, TNT-317, TNT-318, TNT-320, TNT-321, TNT-322, TNT-323, TNT-324, TNT-327, TNT-



328, TNT-330, TNT-331, TNT-332, TNT-333, TNT-334, TNT-335, TNT-336, TNT-337, TNT-412, TNT-413, TNT-414, TNT-417, TNT-418, TNT-419, TNT-420, TNT-421, TNT-422, TNT-423, TNT-424, TNT-425, TNT-426, TNT-427, TNT-428, TNT-429, TNT-430, TNT-431 или TNT-432, где VH-домены являются такими, как показано в Таблице 7, и VL-домены являются такими, как показано в Таблице 8. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен, включающий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен, включающий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L2, антитела, обозначенного как TNT-201, TNT-202, TNT-203, TNT-204, TNT-205, TNT-206, TNT-207, TNT-208, TNT-209, TNT-210, TNT-211, TNT-212, TNT-317, TNT-318, TNT-320, TNT-321, TNT-322, TNT-323, TNT-324, TNT-327, TNT-328, TNT-330, TNT-331, TNT-332, TNT-333, TNT-334, TNT-335, TNT-336 или TNT-337, где CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 являются такими, как показано в Таблице 9. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен, включающий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен, включающий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, антитела, обозначенного как TNT-201, TNT-202, TNT-203, TNT-204, TNT-205, TNT-206, TNT-207, TNT-208, TNT-209, TNT-210, TNT-211, TNT-212, TNT-317, TNT-318, TNT-320, TNT-321, TNT-322, TNT-323, TNT-324, TNT-327, TNT-328, TNT-330, TNT-331, TNT-332, TNT-333, TNT-334, TNT-335, TNT-336 или TNT-337, где CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 являются такими, как показано в Таблице 10. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен, включающий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен, включающий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, антитела, обозначенного как TNT-201, TNT-202, TNT-203, TNT-204, TNT-205, TNT-206, TNT-207, TNT-208, TNT-209, TNT-210, TNT-211, TNT-212, TNT-317, TNT-318, TNT-320, TNT-321, TNT-322, TNT-323, TNT-324, TNT-327, TNT-328, TNT-330, TNT-331, TNT-332, TNT-333, TNT-334, TNT-335, TNT-336 или TNT-337, где CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 являются такими, как показано в Таблице 11. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает тяжелую цепь и легкую цепь антитела, обозначенного как TNT-201, TNT-202, TNT-203, TNT-204, TNT-205, TNT-206, TNT-207, TNT-208, TNT-209, TNT-210, TNT-211, TNT-212, TNT-317, TNT-318, TNT-320, TNT-321, TNT-322, TNT-323, TNT-324, TNT-327, TNT-328, TNT-330, TNT-331, TNT-332, TNT-333, TNT-334, TNT-335, TNT-336, TNT-337, TNT-412, TNT-413, TNT-414, TNT-417, TNT-418, TNT-419, TNT-420, TNT-421, TNT-422, TNT-423, TNT-424, TNT-425, TNT-426, TNT-427, TNT-428, TNT-429, TNT-430, TNT-431 или TNT-432, где легкая цепь является такой, как показано в Таблице 14, и (i) тяжелая цепь включает Q-tag и является такой, как показано в Таблице 15, или (ii) тяжелая цепь является такой, как показано в Таблице 15A.

[0276] В некоторых вариантах осуществления антитело или конъюгат включает переменный легкий цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH). В некоторых вариантах осуществления VH включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, раскрытых в Таблице 7 ниже. В некоторых вариантах



В некоторых вариантах осуществления VL включает последовательность SEQ ID NO:922 и VH включает последовательность SEQ ID NO:923. В некоторых вариантах осуществления VL включает последовательность SEQ ID NO:924 и VH включает последовательность SEQ ID NO:925. В некоторых вариантах осуществления VL включает последовательность SEQ ID NO:926 и VH включает последовательность SEQ ID NO:927. В некоторых вариантах осуществления VL включает последовательность SEQ ID NO:928 и VH включает последовательность SEQ ID NO:929. В некоторых вариантах осуществления VL включает последовательность SEQ ID NO:930 и VH включает последовательность SEQ ID NO:931.

Таблица 7

**VH-домены антител к нектину-4**

| <b>Антитело</b>     | <b>Последовательность</b>  |
|---------------------|--|
| TNT-188;<br>TNT-201 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ<br>GLEWMGWINPNSGGTNYA QKFQGRVTMTRDTSISTA YMELRSLR<br>SDDTAVYYCARGSALHFFGVFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID<br>NO:249)        |
| TNT-189;<br>TNT-202 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG<br>LEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED<br>TAVYYCARGYSSSWYEPYYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID<br>NO:251)        |
| TNT-190;<br>TNT-203 | EVQLVQSGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFSDYYMSWVRQAPGK<br>GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA<br>EDTAVYYCARDEGYYYMDVWGKGT TVTVSS (SEQ ID NO:253)              |
| TNT-191;<br>TNT-204 | EVQLLESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG<br>LEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA<br>EDTAVYYCAKSSYYDYVWGSYRYTDAFDIWGQGT MVTVSS<br>(SEQ ID NO:255) |
| TNT-192;<br>TNT-205 | EVQLLESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG<br>LEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA<br>EDTAVYYCAKDYGYNWNFFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID<br>NO:257)          |
| TNT-193;<br>TNT-206 | QVQLQESGPGLVKPSGTL SLTCTVSGGSISSGGYYWAWIRQPPGK<br>GLEWIGSIYYTGSTYYNPSL KSRVTIYVDTSKNQFSLKLSSVTAAD<br>TAVYYCARDPFPEPPDAFDIWGQGT MVTVSS (SEQ ID NO:259)          |
| TNT-194;<br>TNT-207 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG<br>LEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELRSLRSED  |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
|                                 | TAVYYCASTAVAGFGIDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:261)  |
| TNT-195;<br>TNT-208             | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG<br>LEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED<br>TAVYYCAAGYYYDSSGYYHQ PYYFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID<br>NO:263) |
| TNT-196;<br>TNT-209             | EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKG<br>LEWVSGISWNSGSIGY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE<br>DTAVYYCASSGSWYLPLDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:265)          |
| TNT-197;<br>TNT-210             | EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGK<br>GLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCARATLQLWLPLFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID<br>NO:267)       |
| TNT-198;<br>TNT-211             | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG<br>LEWMGWINPNSGGTNYA QKFQGRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRS<br>EDTAVYYCATGYGDLYYFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:269)            |
| TNT-153;<br>TNT-154;<br>TNT-212 | EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKG<br>LEWVSYISSSSTIYY ADSVKGRFTISRDN AKNSLSLQMNSLRDED<br>TAVYYCARAYYYGMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:271)           |
| TNT-317                         | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIYYSGNTNYNPSL KSRVTISVDMSKNQFSLRLSSVTAADTA<br>VYYCARDFHHDGSA YRWYFDLWGRGTLTVSS (SEQ ID<br>NO:901)     |
| TNT-318                         | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSNYWTWIRQSAGKGL<br>EWIGRIHISESTNYNPSL KSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA<br>VYFCAREGEWKVLGAFDIWGQGT MVTVSS (SEQ ID NO:903)          |
| TNT-320                         | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTVYYIHWVRQAPGQ<br>GLEWMGWISPNSGGTNYA QKFQGRVTMTRDTSISTAYMELTRLR<br>SDDTAIFYCARQTVVTPNWGFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID<br>NO:905)       |
| TNT-321                         | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIYYSGNVNYPNPSL KSRVTISVDASKNQFSLKLTSVTAADTA<br>VYYCAIGGVGAQWDAFDIWGQGT MVTVSS (SEQ ID NO:907)         |
| TNT-322                         | QVQLQESGPGLVKPSATLSLTCTVSGGSISSYYWNWIRQPPGKGL<br>EWIGYIYYSGNTNYPNPSL KSRVTISVDMSKNQFSLKLNSVTAADT  |

|         |  |
|---------|--|
|         | AVYYCARSESYGYWFFYLWGRGTLTVVSS (SEQ ID NO:909)  |
| TNT-323 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYFWNWIRQPPGKGLE<br>WIGYLYYIGTTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTA<br>VYYCARSGNYNDADFIDWGGQTMVTVSS (SEQ ID NO:911)     |
| TNT-324 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFIHWVRQAPGQ<br>GLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRLR<br>SDDTAVYYCARDTFYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID<br>NO:913) |
| TNT-327 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWIWIRQPAGKGL<br>EWIGRIYTTGGAKYNPSLKSRVTMSIDTSKNNFSLKLSSVTAADT<br>AVYFCARDRNWEWNFDLWGRGTLTVVSS (SEQ ID NO:915)       |
| TNT-328 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSMSSYFWSWIRQPPERGL<br>EWWGYMYSGNTNYPNPSLKSRVTTSIDTSKNQFSLKLTSVTAAD<br>TAVYYCARSGNFYWNFDLWGRGTLTVVSS (SEQ ID NO:917)       |
| TNT-330 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSSYNMNWVRQAPGKGL<br>LEWVSSISISSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAED<br>TAVYYCARDRLDDADFIDWGGQTVVTVSS (SEQ ID NO:919)     |
| TNT-331 | QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYSWIRQPAGKGL<br>EWIGRIYTSGSTNYPNPSLKSRVTMSVDTSKNRSLKLSSVTAADT<br>AVYYCAKENWGPSFDYWGQGTTLTVVSS (SEQ ID NO:921)        |
| TNT-332 | QVQLVQSGAEAKKPGASVRVCKTSGYTFTNYIHWVRQAPGQ<br>GLEWMGIINPTLDSTSYAQKFQDRVTMTRDTSTNTDYMDLSSLRF<br>EDTAVYYCARSAGFDAFDIDWGGQTMVTVSS (SEQ ID NO:923)        |
| TNT-333 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTISGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIFYIGNTNYYPSLKSRVTISVDASKNQFSLKLSSVTAADTAV<br>YYCARSYPYWFYFDLWGRGTLTVVSS (SEQ ID NO:925)       |
| TNT-334 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMHWVRQAPGK<br>GLVWVSRINSDGSSSNYADSVKGRFTFSRDNANKNTLYLQMNSLR<br>AEDTAVYFCVRDNWYFDYWGQGTTLTVVSS (SEQ ID NO:927)       |
| TNT-335 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIHYSGISNYPNPSLKSRVAISLDTSNNHFSLKLTSVTAADTAV<br>YFCARGSYWFDPWGQGTTLTVVSS (SEQ ID NO:929)        |
| TNT-336 | KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSNYWMHWVRQVPGE<br>GLVWVSRLLNNGGTSTRYADSVKSRFTISRDNANKNTLYLQMNSLR  |

|         |   |
|---------|---|
|         | AEDTAVYYCVRDWFYFDLWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:931)  |
| TNT-337 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMSWVRQAPGKGL<br>LEWVATISSGGSYTYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE<br>DTAVYYCARQELGSYYAMDYWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO:933)        |
| TNT-412 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG<br>QGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR<br>LRSDDTAVYYCARGSALHFFGVFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID<br>NO:935)     |
| TNT-417 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG<br>LEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED<br>TAVYYCAAGYYYDSSGYYHQPYFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID<br>NO:937) |
| TNT-418 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYYWIWIRQPAGKGL<br>EWIGRIYTTGGAKYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADT<br>AVYFCARDRNWEWNFDLWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:939)            |
| TNT-419 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYYWSWIRQPAGKGL<br>EWIGRIYTTGGAKYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADT<br>AVYYCARDRNWEWNFDLWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:941)            |
| TNT-420 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSMSSYFWSWIRQPPGKGL<br>EWIGYMYSGNTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT<br>AVYYCARSGNFYWNFDLWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:943)             |
| TNT-421 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIFYIGNTYYPYSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV<br>YYCARSYPYWFYFDLWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:945)            |
| TNT-413 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ<br>GLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELRSLR<br>SDDTAVYYCARGSALHFFGVFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID<br>NO:947)     |
| TNT-422 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG<br>LEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELRSLRSED<br>TAVYYCASTAVAGFGIDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:949)           |
| TNT-423 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG<br>LEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED<br>TAVYYCAAGYYYDSSGYYHQPYFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID            |

|         |  |
|---------|--|
|         | NO:951)  |
| TNT-424 | EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGK<br>GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCARATLQLWLPLFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID<br>NO:953)      |
| TNT-425 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYYWIWIRQPAGKGL<br>EWIGRIYTTGGAKYNPSLKSRTMSIDTSKNNFSLKLSSVTAADT<br>AVYFCARDRNWEWNFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:955)            |
| TNT-426 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSMSSYFWSWIRQPPERGL<br>EWVGYMYYSGNTNYNPSLKSRTTMSIDTSKNQFSLKLTSVTAAD<br>TAVYYCARSGNFYWNFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:957)           |
| TNT-427 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTISGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIFYIGNTNYYPSLKSRTISVDASKNQFSLKLSSVTAADTAV<br>YYCARSYPYWFYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:959)            |
| TNT-414 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGYYMHWRQAPG<br>QGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR<br>LRSDDTAVYYCARGSALHFFGVFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID<br>NO:961)       |
| TNT-428 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG<br>LEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED<br>TAVYYCAAGYYYDSSGYYHQPYYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID<br>NO:963) |
| TNT-429 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYYWIWIRQPAGKGL<br>EWIGRIYTTGGAKYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADT<br>AVYFCARDRNWEWNFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:965)            |
| TNT-430 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYYWSWIRQPAGKGL<br>EWIGRIYTTGGAKYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADT<br>AVYYCARDRNWEWNFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:967)            |
| TNT-431 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSMSSYFWSWIRQPPGKGL<br>EWIGYMYYSGNTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT<br>AVYYCARSGNFYWNFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:969)            |
| TNT-432 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIFYIGNTNYYPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV<br>YYCARSYPYWFYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:971)            |

## VL-домены антител к нектину-4

| Антитело            | Последовательность  |
|---------------------|---|
| TNT-188;<br>TNT-201 | DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL<br>LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYS<br>TPLTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:248) |
| TNT-189;<br>TNT-202 | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISNYLAWYQQKPGKAPK<br>LLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY<br>STPYTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO:250) |
| TNT-190;<br>TNT-203 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRL<br>LIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYS<br>TRFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:252)   |
| TNT-191;<br>TNT-204 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR<br>LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYN<br>NWWTFGGGGTKVDIK (SEQ ID NO:254)   |
| TNT-192;<br>TNT-205 | DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISNYLAWYQQKPGKVPK<br>LLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKY<br>NSAPYTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:256) |
| TNT-193;<br>TNT-206 | EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPR<br>LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYG<br>SSPLTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO:258)  |
| TNT-194;<br>TNT-207 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISNYLAWFQQKPGKAPK<br>SLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHD<br>SFPITFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO:260)  |
| TNT-195;<br>TNT-208 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQGISNYLAWYQQKPGKAPK<br>LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY<br>STPLTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:262)  |
| TNT-196;<br>TNT-209 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICQASQDISNYLNWYQQKPGKVPK<br>LLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY<br>STPLTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:264) |
| TNT-197;<br>TNT-210 | EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR<br>LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG<br>SSLTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:266)     |
| TNT-198;            | DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISNYLAWYQQKPGKVPK   |



|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| TNT-211                         | LLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLAISSLQPEDLATYYCQQLN<br>SHPITFGQGTRLEIK (SEQ ID NO:268)   |
| TNT-153;<br>TNT-154;<br>TNT-212 | DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISGWLAWYQQKPGKAP<br>KFLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQA<br>NSFPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:270)         |
| TNT-317                         | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQFPGTAP<br>KLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGT<br>WDSSLNAGWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:900)     |
| TNT-318                         | QTVLTQPSSLSASPGASASLTCTLRSGINVGSYRIYWYQQKPGSPP<br>QFLRLYKSDSDKQQGSGVPSRFSGSKDDSANAGILLISGLQSEDEA<br>DYCYMIWHSSASVFGTGTKVTVL (SEQ ID NO:902) |
| TNT-320                         | QSVLTQSPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPK<br>LLMYGNYQRPSGVPARFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAT<br>WDDSLNGWVFGGGTKVTVL (SEQ ID NO:904)      |
| TNT-321                         | DIQMTQSPSAMSASVGDRTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKVPK<br>RLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHS<br>FYPLTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:906)         |
| TNT-322                         | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQFPGTAP<br>KLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGT<br>WDSSLSAGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:908)      |
| TNT-323                         | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASMSCRSSQSLAYS DGNTYLNWFQQR<br>PGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV<br>YYCMQGTHWPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:910)    |
| TNT-324                         | QTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGYYPNWFQQKPGQ<br>APRALIYSTSNKHSWTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY<br>CLLYYDGAHLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:912)        |
| TNT-327                         | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSDIGSYNLVSWYQQHPGKAP<br>KLMIYEVSMSPSGVSDRFSGSKSGSTASLTISGLQAEDEADYYCSS<br>YAGSSTVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:914)        |
| TNT-328                         | QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTA<br>PKVLISGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQ<br>SYDSSLSGSAVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:916)    |
| TNT-330                         | DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKP<br>GQSPQLLIYTLRYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV  |

|         |   |
|---------|---|
|         | YYCMQRIEFPYTFGGQGTKLEIK (SEQ ID NO:918)   |
| TNT-331 | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAP<br>KLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGT<br>WDTSLSSGWLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:920)   |
| TNT-332 | DIQLTQSPSFLSASVGDKVTITCRASQGINSYLAWYQQKPGKAPK<br>LLIYSASTLQGGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPADFATYCCQQL<br>NSYPFTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:922)       |
| TNT-333 | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAP<br>KLLISDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGT<br>WDSSLSAGVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:924)   |
| TNT-334 | EIVMTQSPATLPVSPGERATLSCRASQSVSINLAWYQQKPGQAPR<br>LLIYGVSTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISGLQSEDFAVYYCQQY<br>NNWPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:926)       |
| TNT-335 | QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSDYIYWYQQLPGTAPK<br>LLIYSNHQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAA<br>WEDSLSGPIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:928)    |
| TNT-336 | QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSGHSFYAIAWHQQQPEKGPR<br>YLMQVNSNGSHNKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADY<br>YCQSWDTDIWFVGGGTKLTVL (SEQ ID NO:930)    |
| TNT-337 | DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNANTYLEWYLQKPG<br>QSPQLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY<br>CFQGSHPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:932) |
| TNT-412 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL<br>LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYS<br>TPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:934)       |
| TNT-417 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPK<br>LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY<br>STPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:936)       |
| TNT-418 | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSDIGSYNLVSWYQQHPGKAP<br>KLMIYEVSMSPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSS<br>YAGSSTVVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:938)     |
| TNT-419 | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSDIGSYNLVSWYQQHPGKAP<br>KLMIYEVSMSPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSS<br>YAGSSTVVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:940)     |

|         |  |
|---------|--|
| TNT-420 | QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGSAVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:942) |
| TNT-421 | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAGVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:944)  |
| TNT-413 | DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:946)       |
| TNT-422 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQHDSFPITFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:948)       |
| TNT-423 | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:950)        |
| TNT-424 | EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:952)         |
| TNT-425 | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSDIGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEVSMCPSGVSDRFSGSKSGSTASLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSSTVVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:954)     |
| TNT-426 | QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKVLISGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGSAVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:956) |
| TNT-427 | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLISDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAGVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:958)  |
| TNT-414 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:960)       |
| TNT-428 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:962)        |
| TNT-429 | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSDIGSYNLVSWYQQHPGKAP  |

|         |  |
|---------|--|
|         | KLMIYEVSMSPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSS<br>YAGSSTVVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:964)   |
| TNT-430 | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTTSDIGSYNLVSWYQQHPGKAP<br>KLMIYEVSMSPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSS<br>YAGSSTVVFGGGTRLTVL (SEQ ID NO:966)   |
| TNT-431 | QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTA<br>PKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSGKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQ<br>SYDSSLGSAVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:968) |
| TNT-432 | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAP<br>KLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSGKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGT<br>WDSSLGSAVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:970)  |

[0277] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH-домен включает последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH-домена, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, раскрытых в Таблице 7 выше. В некоторых вариантах осуществления CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 определены в соответствии с Kabat. В некоторых вариантах осуществления CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 определены в соответствии с Chothia. В некоторых вариантах осуществления CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 определены в соответствии с IMGT.

[0278] В других вариантах осуществления, которые можно комбинировать слюбыми из представленных выше вариантов осуществления, антитело к нектину-4 или конъюгат включает вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности VL-домена, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, раскрытых в Таблице 8 выше. В некоторых вариантах осуществления CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 определены в соответствии с Kabat. В некоторых вариантах осуществления CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 определены в соответствии с Chothia. В некоторых вариантах осуществления CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 определены в соответствии с IMGT.

[0279] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:275, CDR-H2 включает SEQ ID NO:276, CDR-H3 включает SEQ ID NO:277, CDR-L1 включает SEQ ID NO:272, CDR-L2 включает SEQ ID NO:273 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:274.

[0280] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:293,



CDR-H2 включает SEQ ID NO:438, CDR-H3 включает SEQ ID NO:439, CDR-L1 включает SEQ ID NO:434, CDR-L2 включает SEQ ID NO:435 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:436.

[0289] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:455, CDR-H2 включает SEQ ID NO:456, CDR-H3 включает SEQ ID NO:457, CDR-L1 включает SEQ ID NO:452, CDR-L2 включает SEQ ID NO:453 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:454.

[0290] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:473, CDR-H2 включает SEQ ID NO:474, CDR-H3 включает SEQ ID NO:475, CDR-L1 включает SEQ ID NO:470, CDR-L2 включает SEQ ID NO:471 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:472.

[0291] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:281, CDR-H2 включает SEQ ID NO:282, CDR-H3 включает SEQ ID NO:283, CDR-L1 включает SEQ ID NO:278, CDR-L2 включает SEQ ID NO:279 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:280.

[0292] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:299, CDR-H2 включает SEQ ID NO:300, CDR-H3 включает SEQ ID NO:301, CDR-L1 включает SEQ ID NO:296, CDR-L2 включает SEQ ID NO:297 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:298.

[0293] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:317, CDR-H2 включает SEQ ID NO:318, CDR-H3 включает SEQ ID NO:319, CDR-L1 включает SEQ ID NO:314, CDR-L2 включает SEQ ID NO:315 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:316.

[0294] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:335, CDR-H2 включает SEQ ID NO:336, CDR-H3 включает SEQ ID NO:337, CDR-L1 включает SEQ ID NO:332, CDR-L2 включает SEQ ID NO:333 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:334.

[0295] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:353, CDR-H2 включает SEQ ID NO:354, CDR-H3 включает SEQ ID NO:355, CDR-L1 включает SEQ ID NO:350, CDR-L2 включает SEQ ID NO:351 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:352.

[0296] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:371,

CDR-H2 включает SEQ ID NO:372, CDR-H3 включает SEQ ID NO:373, CDR-L1 включает SEQ ID NO:368, CDR-L2 включает SEQ ID NO:369 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:370.

[0297] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:389, CDR-H2 включает SEQ ID NO:390, CDR-H3 включает SEQ ID NO:391, CDR-L1 включает SEQ ID NO:386, CDR-L2 включает SEQ ID NO:387 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:388.

[0298] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:407, CDR-H2 включает SEQ ID NO:408, CDR-H3 включает SEQ ID NO:409, CDR-L1 включает SEQ ID NO:404, CDR-L2 включает SEQ ID NO:405 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:406.

[0299] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:425, CDR-H2 включает SEQ ID NO:426, CDR-H3 включает SEQ ID NO:427, CDR-L1 включает SEQ ID NO:422, CDR-L2 включает SEQ ID NO:423 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:424.

[0300] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:443, CDR-H2 включает SEQ ID NO:444, CDR-H3 включает SEQ ID NO:445, CDR-L1 включает SEQ ID NO:440, CDR-L2 включает SEQ ID NO:441 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:442.

[0301] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:461, CDR-H2 включает SEQ ID NO:462, CDR-H3 включает SEQ ID NO:463, CDR-L1 включает SEQ ID NO:458, CDR-L2 включает SEQ ID NO:459 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:460.

[0302] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:479, CDR-H2 включает SEQ ID NO:480, CDR-H3 включает SEQ ID NO:481, CDR-L1 включает SEQ ID NO:476, CDR-L2 включает SEQ ID NO:477 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:478.

[0303] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:287, CDR-H2 включает SEQ ID NO:288, CDR-H3 включает SEQ ID NO:289, CDR-L1 включает SEQ ID NO:284, CDR-L2 включает SEQ ID NO:285 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:286.

[0304] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:305,





CDR-H2 включает SEQ ID NO:450, CDR-H3 включает SEQ ID NO:451, CDR-L1 включает SEQ ID NO:446, CDR-L2 включает SEQ ID NO:447 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:448.

[0313] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:467, CDR-H2 включает SEQ ID NO:468, CDR-H3 включает SEQ ID NO:469, CDR-L1 включает SEQ ID NO:464, CDR-L2 включает SEQ ID NO:465 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:466.

[0314] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VH-домен и VL-домен, где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:485, CDR-H2 включает SEQ ID NO:486, CDR-H3 включает SEQ ID NO:487, CDR-L1 включает SEQ ID NO:482, CDR-L2 включает SEQ ID NO:483 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:484.

[0315] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:550, CDR-L2 включает SEQ ID NO:551 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:552, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:553, CDR-H2 включает SEQ ID NO:554 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:555.

[0316] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:556, CDR-L2 включает SEQ ID NO:557 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:558, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:559, CDR-H2 включает SEQ ID NO:560 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:561.

[0317] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:562, CDR-L2 включает SEQ ID NO:563 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:564, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:565, CDR-H2 включает SEQ ID NO:566 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:567.

[0318] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:568, CDR-L2 включает SEQ ID NO:569 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:570, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:571, CDR-H2 включает SEQ ID NO:572 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:573.

[0319] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:574, CDR-L2 включает SEQ ID NO:575 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:576, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:577, CDR-H2 включает SEQ ID NO:578 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:579.

[0320] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:580, CDR-L2 включает SEQ ID NO:581 и CDR-L3 включает

SEQ ID NO:582, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:583, CDR-H2 включает SEQ ID NO:584 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:585.

[0321] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:586, CDR-L2 включает SEQ ID NO:587 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:588, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:589, CDR-H2 включает SEQ ID NO:590 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:591.

[0322] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:592, CDR-L2 включает SEQ ID NO:593 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:594, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:595, CDR-H2 включает SEQ ID NO:596 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:597.

[0323] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:598, CDR-L2 включает SEQ ID NO:599 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:600, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:601, CDR-H2 включает SEQ ID NO:602 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:603.

[0324] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:604, CDR-L2 включает SEQ ID NO:605 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:606, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:607, CDR-H2 включает SEQ ID NO:608 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:609.

[0325] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:610, CDR-L2 включает SEQ ID NO:611 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:612, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:613, CDR-H2 включает SEQ ID NO:614 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:615.

[0326] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:616, CDR-L2 включает SEQ ID NO:617 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:618, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:619, CDR-H2 включает SEQ ID NO:620 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:621.

[0327] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:622, CDR-L2 включает SEQ ID NO:623 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:624, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:625, CDR-H2 включает SEQ ID NO:626 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:627.

[0328] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:628, CDR-L2 включает SEQ ID NO:629 и CDR-L3 включает

SEQ ID NO:630, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:631, CDR-H2 включает SEQ ID NO:632 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:633.

[0329] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:634, CDR-L2 включает SEQ ID NO:635 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:636, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:637, CDR-H2 включает SEQ ID NO:638 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:639.

[0330] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:640, CDR-L2 включает SEQ ID NO:641 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:642, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:643, CDR-H2 включает SEQ ID NO:644 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:645.

[0331] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:646, CDR-L2 включает SEQ ID NO:647 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:648, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:649, CDR-H2 включает SEQ ID NO:650 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:651.

[0332] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:652, CDR-L2 включает SEQ ID NO:653 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:654, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:655, CDR-H2 включает SEQ ID NO:656 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:657.

[0333] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:658, CDR-L2 включает SEQ ID NO:659 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:660, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:661, CDR-H2 включает SEQ ID NO:662 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:663.

[0334] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:664, CDR-L2 включает SEQ ID NO:665 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:666, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:667, CDR-H2 включает SEQ ID NO:668 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:669.

[0335] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:670, CDR-L2 включает SEQ ID NO:671 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:672, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:673, CDR-H2 включает SEQ ID NO:674 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:675.

[0336] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:676, CDR-L2 включает SEQ ID NO:677 и CDR-L3 включает

SEQ ID NO:678, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:679, CDR-H2 включает SEQ ID NO:680 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:681.

[0337] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:682, CDR-L2 включает SEQ ID NO:683 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:684, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:685, CDR-H2 включает SEQ ID NO:686 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:687.

[0338] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:688, CDR-L2 включает SEQ ID NO:689 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:690, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:691, CDR-H2 включает SEQ ID NO:692 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:693.

[0339] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:694, CDR-L2 включает SEQ ID NO:695 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:696, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:697, CDR-H2 включает SEQ ID NO:698 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:699.

[0340] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:700, CDR-L2 включает SEQ ID NO:701 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:702, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:703, CDR-H2 включает SEQ ID NO:704 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:705.

[0341] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:706, CDR-L2 включает SEQ ID NO:707 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:708, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:709, CDR-H2 включает SEQ ID NO:710 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:711.

[0342] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:712, CDR-L2 включает SEQ ID NO:713 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:714, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:715, CDR-H2 включает SEQ ID NO:716 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:717.

[0343] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:718, CDR-L2 включает SEQ ID NO:719 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:720, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:721, CDR-H2 включает SEQ ID NO:722 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:723.

[0344] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:724, CDR-L2 включает SEQ ID NO:725 и CDR-L3 включает

SEQ ID NO:726, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:727, CDR-H2 включает SEQ ID NO:728 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:729.

[0345] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:730, CDR-L2 включает SEQ ID NO:731 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:732, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:733, CDR-H2 включает SEQ ID NO:734 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:735.

[0346] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:736, CDR-L2 включает SEQ ID NO:737 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:738, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:739, CDR-H2 включает SEQ ID NO:740 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:741.

[0347] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:742, CDR-L2 включает SEQ ID NO:743 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:744, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:745, CDR-H2 включает SEQ ID NO:746 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:747.

[0348] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:748, CDR-L2 включает SEQ ID NO:749 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:750, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:751, CDR-H2 включает SEQ ID NO:752 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:753.

[0349] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:754, CDR-L2 включает SEQ ID NO:755 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:756, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:757, CDR-H2 включает SEQ ID NO:758 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:759.

[0350] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:760, CDR-L2 включает SEQ ID NO:761 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:762, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:763, CDR-H2 включает SEQ ID NO:764 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:765.

[0351] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:766, CDR-L2 включает SEQ ID NO:767 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:768, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:769, CDR-H2 включает SEQ ID NO:770 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:771.

[0352] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:772, CDR-L2 включает SEQ ID NO:773 и CDR-L3 включает

SEQ ID NO:774, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:775, CDR-H2 включает SEQ ID NO:776 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:777.

[0353] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:778, CDR-L2 включает SEQ ID NO:779 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:780, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:781, CDR-H2 включает SEQ ID NO:782 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:783.

[0354] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:784, CDR-L2 включает SEQ ID NO:785 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:786, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:787, CDR-H2 включает SEQ ID NO:788 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:789.

[0355] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:790, CDR-L2 включает SEQ ID NO:791 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:792, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:793, CDR-H2 включает SEQ ID NO:794 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:795.

[0356] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:796, CDR-L2 включает SEQ ID NO:797 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:798, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:799, CDR-H2 включает SEQ ID NO:800 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:801.

[0357] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:802, CDR-L2 включает SEQ ID NO:803 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:804, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:805, CDR-H2 включает SEQ ID NO:806 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:807.

[0358] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:808, CDR-L2 включает SEQ ID NO:809 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:810, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:811, CDR-H2 включает SEQ ID NO:812 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:813.

[0359] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:814, CDR-L2 включает SEQ ID NO:815 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:816, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:817, CDR-H2 включает SEQ ID NO:818 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:819.

[0360] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:820, CDR-L2 включает SEQ ID NO:821 и CDR-L3 включает

SEQ ID NO:822, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:823, CDR-H2 включает SEQ ID NO:824 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:825.

[0361] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:826, CDR-L2 включает SEQ ID NO:827 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:828, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:829, CDR-H2 включает SEQ ID NO:830 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:831.

[0362] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает VL-домен и VH-домен, где VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:832, CDR-L2 включает SEQ ID NO:833 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:834, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:835, CDR-H2 включает SEQ ID NO:836 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:837.

Таблица 9

## CDR антител к нектину-4 в соответствии с Chothia

| Антитело  | CDR-H1                            | CDR-H2                       | CDR-H3  | CDR-L1                                 | CDR-L2                            | CDR-L3                           |
|---|-----------------------------------|------------------------------|---|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| TNT-188;<br>TNT-201;<br>TNT-413;<br>TNT-412;<br>TNT-414 | GYTFTG<br>Y (SEQ<br>ID<br>NO:275) | NPNSGG<br>(SEQ ID<br>NO:276) | GSALHF<br>FGVFDY<br>(SEQ ID<br>NO:277)            | RASQSIG<br>SYLN<br>(SEQ ID<br>NO:272)  | AASSLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:273)    | QQSYSTPL<br>T (SEQ ID<br>NO:274) |
| TNT-189;<br>TNT-202                                     | GGTFSS<br>Y (SEQ<br>ID<br>NO:293) | IPIFGT<br>(SEQ ID<br>NO:294) | GYSSSW<br>YEPYYF<br>DY (SEQ<br>ID<br>NO:295)      | RASQGIS<br>NYLA<br>(SEQ ID<br>NO:290)  | AASTLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:291)    | QQSYSTP<br>YT (SEQ ID<br>NO:292) |
| TNT-190;<br>TNT-203                                     | GFTFSD<br>Y (SEQ<br>ID<br>NO:311) | SGSGGS<br>(SEQ ID<br>NO:312) | DEGYYY<br>MDV<br>(SEQ ID<br>NO:313)               | RASQSV<br>SSYLA<br>(SEQ ID<br>NO:308)  | DASNRA<br>T (SEQ<br>ID<br>NO:309) | QQSYSTR<br>(SEQ ID<br>NO:310)    |
| TNT-191;<br>TNT-204                                     | GFTFSSY<br>(SEQ ID<br>NO:329)     | SYDGSN<br>(SEQ ID<br>NO:330) | SSYYDY<br>VWGSYR<br>YTDAFDI<br>(SEQ ID<br>NO:331) | RASQSV<br>SSSYLA(<br>SEQ ID<br>NO:326) | GASSRA<br>T (SEQ<br>ID<br>NO:327) | QQYNNW<br>WT (SEQ<br>ID NO:328)  |
| TNT-192;<br>TNT-205                                     | GFTFSSY<br>(SEQ ID                | SYDGSN<br>(SEQ ID            | DYGYN<br>WNFFDY                                   | RASQGIS<br>NYLA                        | AASTLQ<br>S (SEQ ID               | QKYNSAP<br>YT (SEQ ID            |

|   |                                     |                              |  |  |                                   |                                  |
|---|-------------------------------------|------------------------------|--|--|-----------------------------------|----------------------------------|
|   | NO:347)                             | NO:348)                      | (SEQ ID<br>NO:349)                               | (SEQ ID<br>NO:344)                     | NO:345)                           | NO:346)                          |
| TNT-193;<br>TNT-206                                     | GGSISSG<br>GY (SEQ<br>ID<br>NO:365) | YYTGS<br>(SEQ ID<br>NO:366)  | DPFPEPP<br>DAFDI<br>(SEQ ID<br>NO:367)           | RASQSV<br>SSNLA<br>(SEQ ID<br>NO:362)  | GASSRA<br>T (SEQ<br>ID<br>NO:363) | HQYGSSP<br>LT (SEQ ID<br>NO:364) |
| TNT-194;<br>TNT-207;<br>TNT-422                         | GYTFTS<br>Y (SEQ<br>ID<br>NO:383)   | IPIFGT<br>(SEQ ID<br>NO:384) | TAVAGF<br>GIDY<br>(SEQ ID<br>NO:385)             | RASQGIS<br>NYLA<br>(SEQ ID<br>NO:380)  | AASSLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:381)    | LQHDSFPI<br>T (SEQ ID<br>NO:382) |
| TNT-195;<br>TNT-208;<br>TNT-423;<br>TNT-417;<br>TNT-428 | GGTFSS<br>Y (SEQ<br>ID<br>NO:401)   | IPIFGT<br>(SEQ ID<br>NO:402) | GYYYDS<br>SGYYHQ<br>PYYFDY<br>(SEQ ID<br>NO:403) | RASQGIS<br>NYLA<br>(SEQ ID<br>NO:398)  | AASSLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:399)    | QQSYSTPL<br>T (SEQ ID<br>NO:400) |
| TNT-196;<br>TNT-209                                     | GFTFSD<br>Y (SEQ<br>ID<br>NO:419)   | SWNSGS<br>(SEQ ID<br>NO:420) | SGSWYL<br>PLDY<br>(SEQ ID<br>NO:421)             | QASQDIS<br>NYLN<br>(SEQ ID<br>NO:416)  | AASTLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:417)    | QQSYSTPL<br>T (SEQ ID<br>NO:418) |
| TNT-197;<br>TNT-210;<br>TNT-424                         | GFTFSSY<br>(SEQ ID<br>NO:437)       | SYDGSN<br>(SEQ ID<br>NO:438) | ATLQLW<br>LPLFDY<br>(SEQ ID<br>NO:439)           | RASQSV<br>SSSYLA<br>(SEQ ID<br>NO:434) | GASSRA<br>T (SEQ<br>ID<br>NO:435) | QQYGSSL<br>T (SEQ ID<br>NO:436)  |
| TNT-198;<br>TNT-211                                     | GGTFSS<br>Y (SEQ<br>ID<br>NO:455)   | NPNSGG<br>(SEQ ID<br>NO:456) | GYYGDL<br>YYFDY<br>(SEQ ID<br>NO:457)            | RASQGIS<br>NYLA<br>(SEQ ID<br>NO:452)  | AASTLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:453)    | QQLNSHPI<br>T (SEQ ID<br>NO:454) |
| TNT-153;<br>TNT-154<br>TNT-212                          | GGTFSS<br>Y (SEQ<br>ID<br>NO:473)   | SSSSST<br>(SEQ ID<br>NO:474) | AYYYG<br>MDV<br>(SEQ ID<br>NO:475)               | RASQGIS<br>GWLA<br>(SEQ ID<br>NO:470)  | AASTLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:471)    | QQANSFPP<br>T (SEQ ID<br>NO:472) |
| TNT-317   | GGSISSY<br>(SEQ ID<br>NO:553)       | YYSGN<br>(SEQ ID<br>NO:554)  | DFHHYD<br>GSAYRW<br>YFDL                         | SGSSSNI<br>GNNYVS<br>(SEQ ID           | DNNKRP<br>S (SEQ ID<br>NO:551)    | GTWDSSL<br>NAGWV<br>(SEQ ID      |



|   |                                   |                              |  |  |                                       |  |
|---|-----------------------------------|------------------------------|--|--|---------------------------------------|--|
|   |                                   |                              | (SEQ ID<br>NO:555)                     | NO:550)  |                                       | NO:552)                                |
| TNT-318   | GGSISSN<br>(SEQ ID<br>NO:571)     | HISES<br>(SEQ ID<br>NO:572)  | EGEWKV<br>LGAFDI<br>(SEQ ID<br>NO:573) | TLRSGIN<br>VGSYRI<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:568)   | YKSDSD<br>KQQGS<br>(SEQ ID<br>NO:569) | MIWHSSA<br>SV<br>(SEQ ID<br>NO:570)    |
| TNT-320   | GYTFTV<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:589) | SPNSGG<br>(SEQ ID<br>NO:590) | QTVVTP<br>NWGFDY<br>(SEQ ID<br>NO:591) | SGSSSNI<br>GSNTVH<br>(SEQ ID<br>NO:586)        | GNYQRP<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:587)     | ATWDDSL<br>NGWV<br>(SEQ ID<br>NO:588)  |
| TNT-321   | GGSISSY<br>(SEQ ID<br>NO:607)     | YYSGN<br>(SEQ ID<br>NO:608)  | GGVGAQ<br>WDAFDI<br>(SEQ ID<br>NO:609) | RASQGIS<br>NYLA<br>(SEQ ID<br>NO:604)          | AASSLQ<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:605)     | LQHSFYPL<br>T<br>(SEQ ID<br>NO:606)    |
| TNT-322   | GGSISSY<br>(SEQ ID<br>NO:625)     | YYSGN<br>(SEQ ID<br>NO:626)  | SESYGY<br>WFFYL<br>(SEQ ID<br>NO:627)  | SGSSSNI<br>GNNYVS<br>(SEQ ID<br>NO:622)        | DNNKRP<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:623)     | GTWDSSL<br>SAGVV<br>(SEQ ID<br>NO:624) |
| TNT-323   | GGSISSY<br>(SEQ ID<br>NO:643)     | YYIGT<br>(SEQ ID<br>NO:644)  | SGNYYN<br>DAFDI<br>(SEQ ID<br>NO:645)  | RSSQSLA<br>YSDGNT<br>YLN<br>(SEQ ID<br>NO:640) | KVSNRD<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:641)     | MQGTHW<br>PLT<br>(SEQ ID<br>NO:642)    |
| TNT-324   | GYTFTG<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:661) | NPNSGG<br>(SEQ ID<br>NO:662) | DTFYYY<br>YGMDV<br>(SEQ ID<br>NO:663)  | ASSTGA<br>VTSGYY<br>PN<br>(SEQ ID<br>NO:658)   | STSNKH<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:659)     | LLYYDGA<br>HL<br>(SEQ ID<br>NO:660)    |
| TNT-327<br>TNT-425;<br>TNT-418;<br>TNT-419;<br>TNT-429; | GGSISDY<br>(SEQ ID<br>NO:679)     | YTTGG<br>(SEQ ID<br>NO:680)  | DRNWE<br>WNFDL<br>(SEQ ID<br>NO:681)   | TGTTSDI<br>GSYNLV<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:676)   | EVSMS<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:677)      | SSYAGSST<br>VV<br>(SEQ ID<br>NO:678)   |

|   |                                   |                              |                                      |  |                                      |  |
|---|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| TNT-430                                     |                                   |                              |                                      |  |                                      |  |
| TNT-328;<br>TNT-426;<br>TNT-420;<br>TNT-431 | GGSMSS<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:697) | YYSGN<br>(SEQ ID<br>NO:698)  | SGNFYW<br>NFDL<br>(SEQ ID<br>NO:699) | TGSSSNI<br>GAGYNV<br>H<br>(SEQ ID<br>NO:694)   | GNSNRP<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:695)    | QSYDSSL<br>GSAV<br>(SEQ ID<br>NO:696)      |
| TNT-330                                     | GFTFSSY<br>(SEQ ID<br>NO:715)     | SISSSY<br>(SEQ ID<br>NO:716) | DRGLDD<br>AFDI<br>(SEQ ID<br>NO:717) | RSSQSL<br>DSDDGN<br>TYLD<br>(SEQ ID<br>NO:712) | TLSYRA<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:713)    | MQRIEFPY<br>T<br>(SEQ ID<br>NO:714)        |
| TNT-331                                     | GGIRS<br>(SEQ ID<br>NO:733)       | YTS<br>(SEQ ID<br>NO:734)    | ENWG<br>FDY<br>(SEQ ID<br>NO:735)    | SGSSSNI<br>GNYS<br>(SEQ ID<br>NO:730)          | DNNK<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:731)      | GTWDT<br>SSL<br>(SEQ ID<br>NO:732)         |
| TNT-332                                     | GYFT<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:751)   | NPTL<br>(SEQ ID<br>NO:752)   | SAGF<br>FDI<br>(SEQ ID<br>NO:753)    | RASQ<br>NSYLA<br>(SEQ ID<br>NO:748)            | SASTL<br>G<br>(SEQ ID<br>NO:749)     | QQLNS<br>Y<br>FT<br>(SEQ ID<br>NO:750)     |
| TNT-333;<br>TNT-427;<br>TNT-421;<br>TNT-432 | GGSISSY<br>(SEQ ID<br>NO:769)     | FYIGN<br>(SEQ ID<br>NO:770)  | SYPYWY<br>FDL<br>(SEQ ID<br>NO:771)  | SGSSSNI<br>GNYS<br>(SEQ ID<br>NO:766)          | DNNK<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:767)      | GTWDS<br>SSL<br>SAGV<br>(SEQ ID<br>NO:768) |
| TNT-334                                     | GFTFSR<br>(SEQ ID<br>NO:787)      | NSDG<br>(SEQ ID<br>NO:788)   | DNWY<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:789)      | RASQSV<br>SINLA<br>(SEQ ID<br>NO:784)          | GVSTR<br>T<br>(SEQ ID<br>NO:785)     | QQYNN<br>WP<br>RT<br>(SEQ ID<br>NO:786)    |
| TNT-335                                     | GGSISSY<br>(SEQ ID<br>NO:805)     | HYSGI<br>(SEQ ID<br>NO:806)  | GSYW<br>P<br>(SEQ ID<br>NO:807)      | SGSSSNI<br>GSDYI<br>(SEQ ID<br>NO:802)         | SNHQ<br>R<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:803) | AAWED<br>SL<br>SGPI<br>(SEQ ID<br>NO:804)  |
| TNT-336                                     | GFTFSN<br>Y<br>(SEQ ID)           | NNGG<br>(SEQ ID<br>NO:824)   | DWYF<br>(SEQ ID<br>NO:825)           | TLSSG<br>H<br>FYAIA<br>(SEQ ID)                | VNSQ<br>G<br>H<br>NKGD<br>(SEQ ID)   | QSWDT<br>DI<br>WV<br>(SEQ ID)              |

|         |                                   |                              |                                       |  |                                   |                                    |
|---------|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|
|         | NO:823)                           |                              |                                       | NO:820)  | NO:821)                           | NO:822)                            |
| TNT-337 | GFTFSN<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:841) | SSGGSY<br>(SEQ ID<br>NO:842) | QELGSY<br>YAMDY<br>(SEQ ID<br>NO:843) | RSSQSIV<br>HSNANT<br>YLE (SEQ<br>ID<br>NO:838) | KVSNRF<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:839) | FQGSHP<br>YT<br>(SEQ ID<br>NO:840) |

Таблица 10

## CDR антител к нектину-4 в соответствии с Kabat

| Антитело  | CDR-H1                      | CDR-H2  | CDR-H3  | CDR-L1                                 | CDR-L2                            | CDR-L3                           |
|---|-----------------------------|---|---|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| TNT-188;<br>TNT-201;<br>TNT-413;<br>TNT-412;<br>TNT-414 | GYVMH<br>(SEQ ID<br>NO:281) | WINPNS<br>GGTNYA<br>QKFQG<br>(SEQ ID<br>NO:282) | GSALHF<br>FGVFDY<br>(SEQ ID<br>NO:283)            | RASQSI<br>SYLN<br>(SEQ ID<br>NO:278)   | AASSLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:279)    | QQSYSTPL<br>T (SEQ ID<br>NO:280) |
| TNT-189;<br>TNT-202                                     | SYAIS<br>(SEQ ID<br>NO:299) | GIPIFGT<br>ANYAQA<br>FQG<br>(SEQ ID<br>NO:300)  | GYSSSW<br>YEPYYF<br>DY (SEQ<br>ID<br>NO:301)      | RASQGIS<br>NYLA<br>(SEQ ID<br>NO:296)  | AASTLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:297)    | QQSYSTP<br>YT (SEQ ID<br>NO:298) |
| TNT-190;<br>TNT-203                                     | DYYMS<br>(SEQ ID<br>NO:317) | AISGSGG<br>STYYAD<br>SVKG<br>(SEQ ID<br>NO:318) | DEGYYY<br>MDV<br>(SEQ ID<br>NO:319)               | RASQSV<br>SSYLA<br>(SEQ ID<br>NO:314)  | DASNRA<br>T (SEQ<br>ID<br>NO:315) | QQSYSTR<br>(SEQ ID<br>NO:316)    |
| TNT-191;<br>TNT-204                                     | SYGMH<br>(SEQ ID<br>NO:335) | VISYDGS<br>NKYYAD<br>SVKG<br>(SEQ ID<br>NO:336) | SSYYDY<br>VWGSYR<br>YTDAFDI<br>(SEQ ID<br>NO:337) | RASQSV<br>SSSYLA<br>(SEQ ID<br>NO:332) | GASSRA<br>T (SEQ<br>ID<br>NO:333) | QQYNNW<br>WT (SEQ<br>ID NO:334)  |
| TNT-192;<br>TNT-205                                     | SYGMH<br>(SEQ ID<br>NO:353) | VISYDGS<br>NKYYAD<br>SVKG<br>(SEQ ID<br>NO:354) | DYGYN<br>WNFFDY<br>(SEQ ID<br>NO:355)             | RASQGIS<br>NYLA<br>(SEQ ID<br>NO:350)  | AASTLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:351)    | QKYNSAP<br>YT (SEQ ID<br>NO:352) |

|   |                                  |   |  |  |                                   |                                  |
|---|----------------------------------|---|--|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| TNT-193;<br>TNT-206                                     | SGGYW<br>A (SEQ<br>ID<br>NO:371) | SIYYTGS<br>TYYNPS<br>LKS (SEQ<br>ID<br>NO:372)  | DPFPEPP<br>DAFDI<br>(SEQ ID<br>NO:373)           | RASQSV<br>SSNLA<br>(SEQ ID<br>NO:368)  | GASSRA<br>T (SEQ<br>ID<br>NO:369) | HQYGSSP<br>LT (SEQ ID<br>NO:370) |
| TNT-194;<br>TNT-207;<br>TNT-422                         | SYDIN<br>(SEQ ID<br>NO:389)      | GIPIFGT<br>ANYAQK<br>FQG<br>(SEQ ID<br>NO:390)  | TAVAGF<br>GIDY<br>(SEQ ID<br>NO:391)             | RASQGIS<br>NYLA<br>(SEQ ID<br>NO:386)  | AASSLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:387)    | LQHDSFPI<br>T (SEQ ID<br>NO:388) |
| TNT-195;<br>TNT-208;<br>TNT-423;<br>TNT-417;<br>TNT-428 | SYAIS<br>(SEQ ID<br>NO:407)      | GIPIFGT<br>ANYAQK<br>FQG<br>(SEQ ID<br>NO:408)  | GYYYDS<br>SGYYHQ<br>PYYFDY<br>(SEQ ID<br>NO:409) | RASQGIS<br>NYLA<br>(SEQ ID<br>NO:404)  | AASSLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:405)    | QQSYSTPL<br>T (SEQ ID<br>NO:406) |
| TNT-196;<br>TNT-209                                     | DYYMS<br>(SEQ ID<br>NO:425)      | GISWNS<br>GSIGYA<br>DSVKG<br>(SEQ ID<br>NO:426) | SGSWYL<br>PLDY<br>(SEQ ID<br>NO:427)             | QASQDIS<br>NYLN<br>(SEQ ID<br>NO:422)  | AASTLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:423)    | QQSYSTPL<br>T (SEQ ID<br>NO:424) |
| TNT-197;<br>TNT-210;<br>TNT-424                         | SYAMH<br>(SEQ ID<br>NO:443)      | VISYDGS<br>NKYYAD<br>SVKG<br>(SEQ ID<br>NO:444) | ATLQLW<br>LPLFDY<br>(SEQ ID<br>NO:445)           | RASQSV<br>SSSYLA<br>(SEQ ID<br>NO:440) | GASSRA<br>T (SEQ<br>ID<br>NO:441) | QQYGSSL<br>T (SEQ ID<br>NO:442)  |
| TNT-198;<br>TNT-211                                     | SYAIS<br>(SEQ ID<br>NO:461)      | WINPNS<br>GGTNYA<br>QKFQG<br>(SEQ ID<br>NO:462) | GYYGDL<br>YYFDY<br>(SEQ ID<br>NO:463)            | RASQGIS<br>NYLA<br>(SEQ ID<br>NO:458)  | AASTLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:459)    | QQLNSHPI<br>T (SEQ ID<br>NO:460) |
| TNT-153;<br>TNT-154<br>TNT-212                          | SYNMN<br>(SEQ ID<br>NO:479)      | YISSSSS<br>TIYYADS<br>VKG<br>(SEQ ID<br>NO:480) | AYYYG<br>MDV<br>(SEQ ID<br>NO:481)               | RASQGIS<br>GWLA<br>(SEQ ID<br>NO:476)  | AASTLQ<br>S (SEQ ID<br>NO:477)    | QQANSFPP<br>T (SEQ ID<br>NO:478) |

|         |                             |   |  |  |                                   |  |
|---------|-----------------------------|---|--|--|-----------------------------------|--|
| TNT-317 | SYFWS<br>(SEQ ID<br>NO:559) | YIYYSG<br>NTNYNP<br>SLKS<br>(SEQ ID<br>NO:560)  | DFHHYD<br>GSAYRW<br>YFDL<br>(SEQ ID<br>NO:561) | SGSSSNI<br>GNNYVS<br>(SEQ ID<br>NO:556)        | DNNKRP<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:557) | GTWDSSL<br>NAGWV<br>(SEQ ID<br>NO:558) |
| TNT-318 | SNYWT<br>(SEQ ID<br>NO:577) | RIHISEST<br>NYNPSL<br>KS<br>(SEQ ID<br>NO:578)  | EGEWKV<br>LGAFDI<br>(SEQ ID<br>NO:579)         | TLRSGIN<br>VGSYRI<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:574)   | SDKQQG<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:575) | MIWHSSA<br>SV<br>(SEQ ID<br>NO:576)    |
| TNT-320 | VYYIH<br>(SEQ ID<br>NO:595) | WISPNSG<br>GTNYAQ<br>KFQG<br>(SEQ ID<br>NO:596) | QTVVTP<br>NWGFDY<br>(SEQ ID<br>NO:597)         | SGSSSNI<br>GSNTVH<br>(SEQ ID<br>NO:592)        | GNYQRP<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:593) | ATWDDSL<br>NGWV<br>(SEQ ID<br>NO:594)  |
| TNT-321 | SYYWS<br>(SEQ ID<br>NO:613) | YIYYSG<br>NVNYNP<br>SLKS<br>(SEQ ID<br>NO:614)  | GGVGAQ<br>WDAFDI<br>(SEQ ID<br>NO:615)         | RASQGIS<br>NYLA<br>(SEQ ID<br>NO:610)          | AASSLQ<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:611) | LQHSFYPL<br>T<br>(SEQ ID<br>NO:612)    |
| TNT-322 | SYYWN<br>(SEQ ID<br>NO:631) | YIYYSG<br>NTNYNP<br>SLKS<br>(SEQ ID<br>NO:632)  | SESYGY<br>WFFYL<br>(SEQ ID<br>NO:633)          | SGSSSNI<br>GNNYVS<br>(SEQ ID<br>NO:628)        | DNNKRP<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:629) | GTWDSSL<br>SAGVV<br>(SEQ ID<br>NO:630) |
| TNT-323 | SYFWN<br>(SEQ ID<br>NO:649) | YLYYIG<br>TTNYNP<br>SLKS<br>(SEQ ID<br>NO:650)  | SGNYYN<br>DAFDI<br>(SEQ ID<br>NO:651)          | RSSQSLA<br>YSDGNT<br>YLN<br>(SEQ ID<br>NO:646) | KVSNRD<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:647) | MQGTHW<br>PLT<br>(SEQ ID<br>NO:648)    |
| TNT-324 | GYFIH<br>(SEQ ID<br>NO:667) | WINPNS<br>GGTNYA<br>QKFQG<br>(SEQ ID<br>NO:668) | DTFYYY<br>YGMDV<br>(SEQ ID<br>NO:669)          | ASSTGA<br>VTSGYY<br>PN<br>(SEQ ID<br>NO:664)   | STSNKH<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:665) | LLYYDGA<br>HL<br>(SEQ ID<br>NO:666)    |

|   |                             |  |   |   |                                       |   |
|---|-----------------------------|--|---|---|---------------------------------------|---|
| TNT-327;<br>TNT-425;<br>TNT-418;<br>TNT-419;<br>TNT-429;<br>TNT-430 | DYYWI<br>(SEQ ID<br>NO:685) | RIYTTGG<br>AKYNPS<br>LKS<br>(SEQ ID<br>NO:686)     | DRNWE<br>WNFDL<br>(SEQ ID<br>NO:687)    | TGTTSDI<br>GSYNLV<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:682)        | EVSMS<br>P<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:683) | SSYAGSST<br>VV<br>(SEQ ID<br>NO:684)        |
| TNT-328;<br>TNT-426;<br>TNT-420;<br>TNT-431                         | SYFWS<br>(SEQ ID<br>NO:703) | YMYYS<br>G<br>NTNYNP<br>SLKS<br>(SEQ ID<br>NO:704) | SGNFYW<br>NFDL<br>(SEQ ID<br>NO:705)    | TGSSSNI<br>GAGYNV<br>H<br>(SEQ ID<br>NO:700)        | GNSNRP<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:701)     | QSYDSSL<br>S<br>GSAV<br>(SEQ ID<br>NO:702)  |
| TNT-330   | SYNMN<br>(SEQ ID<br>NO:721) | SISISSY<br>IYYADS<br>VKG<br>(SEQ ID<br>NO:722)     | DRGLDD<br>AFDI<br>(SEQ ID<br>NO:723)    | RSSQSL<br>L<br>DSDDGN<br>TYLD<br>(SEQ ID<br>NO:718) | TLSYRA<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:719)     | MQRIEFP<br>Y<br>T<br>(SEQ ID<br>NO:720)     |
| TNT-331   | SYYWS<br>(SEQ ID<br>NO:739) | RIYTS<br>GS<br>TNYNPS<br>LKS<br>(SEQ ID<br>NO:740) | ENWG<br>PS<br>FDY<br>(SEQ ID<br>NO:741) | SGSSSNI<br>GNNYVS<br>(SEQ ID<br>NO:736)             | DNNKRP<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:737)     | GTWDTSL<br>S<br>SSGWL<br>(SEQ ID<br>NO:738) |
| TNT-332   | NYYIH<br>(SEQ ID<br>NO:757) | IINPTLD<br>STSYAQ<br>KFQD<br>(SEQ ID<br>NO:758)    | SAGFDA<br>FDI<br>(SEQ ID<br>NO:759)     | RASQGI<br>NSYLA<br>(SEQ ID<br>NO:754)               | SASTLQ<br>G<br>(SEQ ID<br>NO:755)     | QQLNSYP<br>FT<br>(SEQ ID<br>NO:756)         |
| TNT-333;<br>TNT-427;<br>TNT-421;<br>TNT-432                         | SYYWS<br>(SEQ ID<br>NO:775) | YIFYIGN<br>TNYYP<br>S<br>LKS<br>(SEQ ID<br>NO:776) | SYPYWY<br>FDL<br>(SEQ ID<br>NO:777)     | SGSSSNI<br>GNNYVS<br>(SEQ ID<br>NO:772)             | DNNKRP<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:773)     | GTWDSSL<br>S<br>SAGVV<br>(SEQ ID<br>NO:774) |
| TNT-334   | RYWMH<br>(SEQ ID<br>NO:793) | RINSDGS<br>SSNYAD<br>SVKG<br>(SEQ ID<br>NO:794)    | DNWYFD<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:795)       | RASQSV<br>SINLA<br>(SEQ ID<br>NO:790)               | GVSTRA<br>T<br>(SEQ ID<br>NO:791)     | QQYNNWP<br>RT<br>(SEQ ID<br>NO:792)         |

|         |                             |   |                                       |  |                                   |                                       |
|---------|-----------------------------|---|---------------------------------------|--|-----------------------------------|---------------------------------------|
|         |                             | NO:794)   |                                       |  |                                   |                                       |
| TNT-335 | SYWWS<br>(SEQ ID<br>NO:811) | YIHYSGI<br>SNYNPS<br>LKS<br>(SEQ ID<br>NO:812)  | GSYWFD<br>P<br>(SEQ ID<br>NO:813)     | SGSSSNI<br>GSDYIY<br>(SEQ ID<br>NO:808)        | SNHQRP<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:809) | AAWEDSL<br>SGPI<br>(SEQ ID<br>NO:810) |
| TNT-336 | NYWMH<br>(SEQ ID<br>NO:829) | RLNNGG<br>TSTRYA<br>DSVKS<br>(SEQ ID<br>NO:830) | DWYFDL<br>(SEQ ID<br>NO:831)          | TLSSGHS<br>FYAIA<br>(SEQ ID<br>NO:826)         | GSHNKG<br>D<br>(SEQ ID<br>NO:827) | QSWDTDI<br>WV<br>(SEQ ID<br>NO:828)   |
| TNT-337 | NYDMS<br>(SEQ ID<br>NO:847) | TISSGGS<br>YTYVVD<br>SVKG<br>(SEQ ID<br>NO:848) | QELGSY<br>YAMDY<br>(SEQ ID<br>NO:849) | RSSQSIV<br>HSNANT<br>YLE<br>(SEQ ID<br>NO:844) | KVSNRF<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:845) | FQGSHP<br>YT<br>(SEQ ID<br>NO:846)    |

Таблица 11

## CDR антител к нектину-4 в соответствии с IMGT

| Антитело  | CDR-H1                             | CDR-H2                          | CDR-H3   | CDR-L1                       | CDR-L2                    | CDR-L3                           |
|---|------------------------------------|---------------------------------|--|------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| TNT-188;<br>TNT-201;<br>TNT-413;<br>TNT-412;<br>TNT-414 | GYTFTG<br>YY (SEQ<br>ID<br>NO:287) | INPNSGG<br>T (SEQ ID<br>NO:288) | ARGSAL<br>HFFGVF<br>DY (SEQ<br>ID<br>NO:289)   | QSISSY<br>(SEQ ID<br>NO:284) | AAS<br>(SEQ ID<br>NO:285) | QQSYSTPL<br>T (SEQ ID<br>NO:286) |
| TNT-189;<br>TNT-202                                     | GGTFSS<br>YA (SEQ<br>ID<br>NO:305) | IPIFGTA<br>(SEQ ID<br>NO:306)   | ARGYSS<br>SWYEPY<br>YFDY<br>(SEQ ID<br>NO:307) | QGISNY<br>(SEQ ID<br>NO:302) | AAS<br>(SEQ ID<br>NO:303) | QQSYSTP<br>YT (SEQ ID<br>NO:304) |
| TNT-190;<br>TNT-203                                     | GFTFSD<br>YY (SEQ<br>ID<br>NO:323) | ISGSGGS<br>T (SEQ ID<br>NO:324) | ARDEGY<br>YYMDV<br>(SEQ ID<br>NO:325)          | QSVSSY<br>(SEQ ID<br>NO:320) | DAS<br>(SEQ ID<br>NO:321) | QQSYSTR<br>(SEQ ID<br>NO:322)    |
| TNT-191;  | GFTFSSY                            | ISYDGSN                         | AKSSYY   | QSVSSSY                      | GAS                       | QQYNNW                           |

|   |                             |                           |  |                         |                     |                            |
|---|-----------------------------|---------------------------|--|-------------------------|---------------------|----------------------------|
| TNT-204   | G (SEQ ID NO:341)           | K (SEQ ID NO:342)         | DYVWGS YRYTDA FDI (SEQ ID NO:343)      | (SEQ ID NO:338)         | (SEQ ID NO:339)     | WT (SEQ ID NO:340)         |
| TNT-192;<br>TNT-205                                     | GFTFSSY G (SEQ ID NO:359)   | ISYDGSN K (SEQ ID NO:360) | AKDYGY NWNFFD Y (SEQ ID NO:361)        | QGISNY (SEQ ID NO:356)  | AAS (SEQ ID NO:357) | QKYNSAP YT (SEQ ID NO:358) |
| TNT-193;<br>TNT-206                                     | GGSISSG GYY (SEQ ID NO:377) | IYYTGST (SEQ ID NO:378)   | ARDPFPE PPDAFDI (SEQ ID NO:379)        | QSVSSN (SEQ ID NO:374)  | GAS (SEQ ID NO:375) | HQYGSSP LT (SEQ ID NO:376) |
| TNT-194;<br>TNT-207;<br>TNT-422                         | GYTFTS YD (SEQ ID NO:395)   | IPIFGTA (SEQ ID NO:396)   | ASTAVA GFGIDY (SEQ ID NO:397)          | QGISNY (SEQ ID NO:392)  | AAS (SEQ ID NO:393) | LQHDSFPI T (SEQ ID NO:394) |
| TNT-195;<br>TNT-208;<br>TNT-423;<br>TNT-417;<br>TNT-428 | GGTFSS YA (SEQ ID NO:413)   | IPIFGTA (SEQ ID NO:414)   | AAGYYY DSSGYY HQPYF DY (SEQ ID NO:415) | QGISNY (SEQ ID NO:410)  | AAS (SEQ ID NO:411) | QQSYSTPL T (SEQ ID NO:412) |
| TNT-196;<br>TNT-209                                     | GFTFSD YY (SEQ ID NO:431)   | ISWNSGS I (SEQ ID NO:432) | ASSGSW YLPLDY (SEQ ID NO:433)          | QDISNY (SEQ ID NO:428)  | AAS (SEQ ID NO:429) | QQSYSTPL T (SEQ ID NO:430) |
| TNT-197;<br>TNT-210;<br>TNT-424                         | GFTFSSY A (SEQ ID NO:449)   | ISYDGSN K (SEQ ID NO:450) | ARATLQ LWLPLF DY (SEQ ID NO:451)       | QSVSSSY (SEQ ID NO:446) | GAS (SEQ ID NO:447) | QQYGSSL T (SEQ ID NO:448)  |
| TNT-198;  | GGTFSS                      | INPNSGG                   | ATGYYG                                 | QGISNY                  | AAS                 | QQLNSHPI                   |



|                                |                           |                           |                                       |                             |                          |                               |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| TNT-211                        | YA (SEQ ID NO:467)        | T (SEQ ID NO:468)         | DLYYFD Y (SEQ ID NO:469)              | (SEQ ID NO:464)             | (SEQ ID NO:465)          | T (SEQ ID NO:466)             |
| TNT-153;<br>TNT-154<br>TNT-212 | GFTFSSY N (SEQ ID NO:485) | ISSSSSTI (SEQ ID NO:486)  | ARAYYY GMDV (SEQ ID NO:487)           | QGISGW (SEQ ID NO:482)      | AAS (SEQ ID NO:483)      | QQANSFPP T (SEQ ID NO:484)    |
| TNT-317                        | GGSISSY F (SEQ ID NO:565) | IYYSGNT (SEQ ID NO:566)   | ARDFHH YDGSAY RWFYFDL (SEQ ID NO:567) | SSNIGNN Y (SEQ ID NO:562)   | DNN (SEQ ID NO:563)      | GTWDSSL NAGWV (SEQ ID NO:564) |
| TNT-318                        | GGSISSN Y (SEQ ID NO:583) | IHISEST (SEQ ID NO:584)   | AREGEW KVLGAF DI (SEQ ID NO:585)      | SGINVG S YR (SEQ ID NO:580) | YKSDSD K (SEQ ID NO:581) | MIWHSSA SV (SEQ ID NO:582)    |
| TNT-320                        | GYTFTV YY (SEQ ID NO:601) | ISPNSGG T (SEQ ID NO:602) | ARQTVV TPNWGF DY (SEQ ID NO:603)      | SSNIGSN T (SEQ ID NO:598)   | GN Y (SEQ ID NO:599)     | ATWDDSL NGWV (SEQ ID NO:600)  |
| TNT-321                        | GGSISSY Y (SEQ ID NO:619) | IYYSGN V (SEQ ID NO:620)  | AIGGVG AQWDAF DI (SEQ ID NO:621)      | QGISNY (SEQ ID NO:616)      | AAS (SEQ ID NO:617)      | LQHSFYPL T (SEQ ID NO:618)    |
| TNT-322                        | GGSISSY Y (SEQ ID NO:637) | IYYSGNT (SEQ ID NO:638)   | ARSESY GYWFFY L (SEQ ID NO:639)       | SSNIGNN Y (SEQ ID NO:634)   | DNN (SEQ ID NO:635)      | GTWDSSL SAGVV (SEQ ID NO:636) |
| TNT-323                        | GGSISSY                   | LYYIGTT                   | ARSGNY                                | QSLAYS                      | KVS                      | MQGTHW                        |

|   |                                    |                                    |   |  |                           |  |
|---|------------------------------------|------------------------------------|---|--|---------------------------|--|
|   | F<br>(SEQ ID<br>NO:655)            | (SEQ ID<br>NO:656)                 | YNDAFD<br>I<br>(SEQ ID<br>NO:657)           | DGNTY<br>(SEQ ID<br>NO:652)            | (SEQ ID<br>NO:653)        | PLT<br>(SEQ ID<br>NO:654)              |
| TNT-324   | GYTFTG<br>YF<br>(SEQ ID<br>NO:673) | INPNSGG<br>T<br>(SEQ ID<br>NO:674) | ARDTFY<br>YYYGM<br>DV<br>(SEQ ID<br>NO:675) | TGAVTS<br>GY<br>(SEQ ID<br>NO:670)     | STS<br>(SEQ ID<br>NO:671) | LLYYDGA<br>HL<br>(SEQ ID<br>NO:672)    |
| TNT-327;<br>TNT-425;<br>TNT-418;<br>TNT-419;<br>TNT-429;<br>TNT-430 | GGISIDY<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:691) | IYTTGG<br>A<br>(SEQ ID<br>NO:692)  | ARDRN<br>WEWNF<br>DL<br>(SEQ ID<br>NO:693)  | TSDIGSY<br>NL<br>(SEQ ID<br>NO:688)    | EVS<br>(SEQ ID<br>NO:689) | SSYAGSST<br>VV<br>(SEQ ID<br>NO:690)   |
| TNT-328;<br>TNT-426;<br>TNT-420;<br>TNT-431                         | GGSMSS<br>YF<br>(SEQ ID<br>NO:709) | MYYSNG<br>T<br>(SEQ ID<br>NO:710)  | ARSGNF<br>YWNFDL<br>(SEQ ID<br>NO:711)      | SSNIGAG<br>YN<br>(SEQ ID<br>NO:706)    | GNS<br>(SEQ ID<br>NO:707) | QSYDSSL<br>GSAV<br>(SEQ ID<br>NO:708)  |
| TNT-330   | GFTFSSY<br>N<br>(SEQ ID<br>NO:727) | ISISSYI<br>(SEQ ID<br>NO:728)      | ARDRGL<br>DDAFDI<br>(SEQ ID<br>NO:729)      | QSLDLS<br>DDGNTY<br>(SEQ ID<br>NO:724) | TLS<br>(SEQ ID<br>NO:725) | MQRIEFPY<br>T<br>(SEQ ID<br>NO:726)    |
| TNT-331   | GGSIRSY<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:745) | IYTSGST<br>(SEQ ID<br>NO:746)      | AKENW<br>GPSFDY<br>(SEQ ID<br>NO:747)       | SSNIGNN<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:742)     | DNN<br>(SEQ ID<br>NO:743) | GTWDTSL<br>SSGWL<br>(SEQ ID<br>NO:744) |
| TNT-332   | GYTFTN<br>YY<br>(SEQ ID<br>NO:763) | INPTLDS<br>T<br>(SEQ ID<br>NO:764) | ARSAGF<br>DAFDI<br>(SEQ ID<br>NO:765)       | QGINSY<br>(SEQ ID<br>NO:760)           | SAS<br>(SEQ ID<br>NO:761) | QQLNSYP<br>FT<br>(SEQ ID<br>NO:762)    |
| TNT-333;<br>TNT-427;<br>TNT-421;                                    | GGSISSY<br>Y<br>(SEQ ID)           | IFYIGNT<br>(SEQ ID<br>NO:782)      | ARSYPY<br>WYFDL<br>(SEQ ID)                 | SSNIGNN<br>Y<br>(SEQ ID)               | DNN<br>(SEQ ID<br>NO:779) | GTWDSSL<br>SAGVV<br>(SEQ ID)           |

|         |                                    |                                    |   |                                       |                                   |                                       |
|---------|------------------------------------|------------------------------------|---|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| TNT-432 | NO:781)                            |                                    | NO:783)                                     | NO:778)                               |                                   | NO:780)                               |
| TNT-334 | GFTFSRY<br>W<br>(SEQ ID<br>NO:799) | INSDGSS<br>S<br>(SEQ ID<br>NO:800) | VRDNW<br>YFDY<br>(SEQ ID<br>NO:801)         | QSVSIN<br>(SEQ ID<br>NO:796)          | GVS<br>(SEQ ID<br>NO:797)         | QQYNNWP<br>RT<br>(SEQ ID<br>NO:798)   |
| TNT-335 | GGSISSY<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:817) | IHYSGIS<br>(SEQ ID<br>NO:818)      | ARGSYW<br>FDP<br>(SEQ ID<br>NO:819)         | SSNIGSD<br>Y<br>(SEQ ID<br>NO:814)    | SNH<br>(SEQ ID<br>NO:815)         | AAWEDSL<br>SGPI<br>(SEQ ID<br>NO:816) |
| TNT-336 | GFTFSN<br>YW<br>(SEQ ID<br>NO:835) | LNNGGT<br>ST<br>(SEQ ID<br>NO:836) | VRDWYF<br>DL<br>(SEQ ID<br>NO:837)          | SGHSFY<br>A<br>(SEQ ID<br>NO:832)     | VNSQGS<br>H<br>(SEQ ID<br>NO:833) | QSWDTDI<br>WV<br>(SEQ ID<br>NO:834)   |
| TNT-337 | GFTFSN<br>YD (SEQ<br>ID<br>NO:853) | ISSGGSY<br>T (SEQ ID<br>NO:854)    | ARQELG<br>SYYAMD<br>Y (SEQ<br>ID<br>NO:855) | QSIVHSN<br>ANTY<br>(SEQ ID<br>NO:850) | KVS<br>(SEQ ID<br>NO:851)         | FQGSHPV<br>YT<br>(SEQ ID<br>NO:852)   |

[0363] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, раскрытых в Таблице 12 ниже. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 включает тяжелую цепь, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, раскрытых в Таблице 13 ниже.

Таблица 12

## Легкая цепь мышинового IgG2a антитела к нектину-4

| Антитело | Последовательность   |
|----------|--|
| TNT-188  | divmtqspsslsasvgrvtitcrasqsisynlwyqqkpgkapkliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftlti<br>sslqpedfatyyccqsystpltfqggtkveiKRadaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfydkdinvk<br>wkidgserqngvlnswtdqskdstysmsstlftkdeyerhnsytceathktstspivksfnrec (SEQ<br>ID NO:212)  |
| TNT-189  | dilqtqspsslsasvgrvtitcrasqgisnylawyqqkpgkapkliyaastlqsgvpsrfsqsgsgtdftltis<br>slqpedfatyyccqsystpytfqggtkleiKRadaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfydkdinvk<br>wkidgserqngvlnswtdqskdstysmsstlftkdeyerhnsytceathktstspivksfnrec (SEQ<br>ID NO:213) |

|         |  |
|---------|--|
| TNT-190 | eivltqspatlsispgeratlscrasqsvssylawyqqkpgqaprlliydasnratgiparfsgsgsgtdftltiss<br>lqaedfatyycqqysytrfgggkveiKRadaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfykdinvkwi<br>dgserqngvlnswtdqskdstysmsstlttkdeyerhnsytceathktstspivksfnrec (SEQ ID<br>NO:214)      |
| TNT-191 | eivltqspatlsispgeratlscrasqsvssylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltis<br>rlepedfavyyccqynnwtfgggkvdikRadaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfykdin<br>kwkidgserqngvlnswtdqskdstysmsstlttkdeyerhnsytceathktstspivksfnrec<br>(SEQ ID NO:215)      |
| TNT-192 | divmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgisnylawyqqkpgkvpklliyaastlqsgvpsrfsfgsgsgtdftlti<br>sslqpedvatyycqkynsapytfggkveiKRadaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfykdin<br>kwkidgserqngvlnswtdqskdstysmsstlttkdeyerhnsytceathktstspivksfnrec<br>(SEQ ID NO:216)    |
| TNT-193 | eivltqspatlsvspgeratlscrasqsvssnlawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltisr<br>lepedfavyychqygsspltfgggkveiKRadaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfykdinvk<br>kidgserqngvlnswtdqskdstysmsstlttkdeyerhnsytceathktstspivksfnrec (SEQ<br>ID NO:217)    |
| TNT-194 | diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgisnylawfqqkpgkapkslisaasslqsgvpsrfsfgsgsgtdftlti<br>sslqpedfatyyclqhdspitfggkveiKRadaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfykdinvk<br>wkidgserqngvlnswtdqskdstysmsstlttkdeyerhnsytceathktstspivksfnrec (SEQ<br>ID NO:218)    |
| TNT-195 | diqmtqspstlsasvgdrvtitcrasqgisnylawyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsfgsgsgtdftlti<br>sslqpedfatyycqqysystpltfgggkveiKRadaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfykdinvk<br>wkidgserqngvlnswtdqskdstysmsstlttkdeyerhnsytceathktstspivksfnrec (SEQ<br>ID NO:219) |
| TNT-196 | diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqdisnylnwyqqkpgkvpklliyaastlqsgvpsrfsfgsgsgtdftlt<br>isslqpedfatyycqqysystpltfgggkveiKRadaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfykdinvk<br>wkidgserqngvlnswtdqskdstysmsstlttkdeyerhnsytceathktstspivksfnrec (SEQ<br>ID NO:220) |
| TNT-197 | eivltqspgtlslspgeratlscrasqsvssylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltis<br>rlepedfavyyccqygssltfgggkveiKRadaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfykdinvk<br>kidgserqngvlnswtdqskdstysmsstlttkdeyerhnsytceathktstspivksfnrec (SEQ<br>ID NO:221)     |
| TNT-198 | divmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgisnylawyqqkpgkvpklliyaastlqsgvpsrfsfgsgsgteftla<br>isslqpedlatyycqqlnshpitfggtrleiKRadaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfykdinvk   |

|         |  |
|---------|--|
|         | wkldgserqngvlnswtdqdskdstysmsstlftkdeyerhnsytceathktstspivksfnrec (SEQ ID NO:222)  |
| TNT-153 | Diqmtqspssvsasvgrvritcrasqgisgwlawyqqkpgkapkfliyaastlqsgvpsrfsqsgsgtdft<br>ltisslqpedfatyycqqansfpptfgggtkveikradaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfykpdinv<br>kwkidgserqngvlnswtdqdskdstysmsstlftkdeyerhnsytceathktstspivksfnrec<br>(SEQ ID NO:223) |

Таблица 13

## Тяжелая цепь с Q-tag мышиноного IgG2a антитела к нектину-4

| Антитело | Последовательность   |
|----------|--|
| TNT-188  | evqlvqsgaevkkpgssvkvscasgytftgyumhwvrqapggglewmgwinpnsngtnyaqkfqq<br>rvtmtrdtsistaymelrslrsddtavyyccargssalhhffgfdywgggtlvtvsSakttapsvyplapvcgdt<br>gssvtlgclvkgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvsstwpsqsitcnvahpasstkv<br>dkkieprgptikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvn<br>nvevhtaqtqthredynstlrsvsalpihqhdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpksvrapqvyv<br>lpppeeemtkkqvltcmvtdfmpediyvewtngktelnykntepvldsdgsyfmysklrvekknwv<br>ernsyscsvgheglhnhhttkfsrtpgrpqfgpp (SEQ ID NO:200) |
| TNT-189  | evqlvqsgaevkkpgssvkvscasggfssyaiswvrqapggglewmggiipifgtanyaqkfqrvti<br>tadeststaymelsslrsedtavyyccargysssweyppyfdywgggtlvtvsSakttapsvyplapvcgdt<br>gssvtlgclvkgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvsstwpsqsitcnvahpasstkv<br>dkkieprgptikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvn<br>nvevhtaqtqthredynstlrsvsalpihqhdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpksvrapqvyv<br>lpppeeemtkkqvltcmvtdfmpediyvewtngktelnykntepvldsdgsyfmysklrvekknwv<br>ernsyscsvgheglhnhhttkfsrtpgrpqfgpp (SEQ ID NO:201)  |
| TNT-190  | evqlvqsggglvkpggslrlscaasgftfsdyymwvrqapggglewvsaisgsggstyyadsvkgrftis<br>rdnskntlylqmnsraedtavyyccardegyyymdvwkggtvtvsSakttapsvyplapvcgdtgssv<br>tlgclvkgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvsstwpsqsitcnvahpasstkvdkki<br>eprgptikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvnnvev<br>htaqtqthredynstlrsvsalpihqhdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpksvrapqvyvlppp<br>eeemtkkqvltcmvtdfmpediyvewtngktelnykntepvldsdgsyfmysklrvekknwv<br>ernsyscsvgheglhnhhttkfsrtpgrpqfgpp (SEQ ID NO:202)       |
| TNT-191  | evqllesgggvvqpgrslrlscaasgftfsygmhwvrqapggglewvavisydgsknyyadsvkgrfti<br>srdnskntlylqmnsraedtavyyccakssyydyvwgsyrytdafdiwgggtmvtvsSakttapsvypla<br>pvcgdtgssvtlgclvkgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvsstwpsqsitcnvah<br>passtkvdkkieprgptikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvq   |

|         |   |
|---------|---|
|         | iswfvnnvevhtaqtqthredynstlrsvsalpihqhdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpkgsvrapqvyvlpppeeemtkkqvtlcmvtdfmpediyvewtnngktelnykntepvldsdsyfmysklrvekknwvernsyscsvvheglhnhhttkfsrtpgrpqgfgpp (SEQ ID NO:203)   |
| TNT-192 | evqllesgggvvqpgrslrlscaasgftfssygmhwwvrqapkgglewvavisydgsnkyyadsvkgrftisrdnsknlylqmnsraedtavyycakdygynwnffdywgqglvtvsSakttapsvyplapvcgdtgssvtlgclvkgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvsstwpsqsitcnvahpasstkvdkkieprgptikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvnnvevhtaqtqthredynstlrsvsalpihqhdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpkgsvrapqvyvlpppeeemtkkqvtlcmvtdfmpediyvewtnngktelnykntepvldsdsyfmysklrvekknwvernsyscsvvheglhnhhttkfsrtpgrpqgfgpp (SEQ ID NO:204)      |
| TNT-193 | qvqlqesgpglvkpsgtlslctvsggsissgyywwawirpppgglewigsiyytgstyynpslksrvtiyvdtsknqfslklssvtaadtavyycardpfpeppdafdiwgqgtmvtvsSakttapsvyplapvcgdtgssvtlgclvkgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvsstwpsqsitcnvahpasstkvdkkieprgptikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvnnvevhtaqtqthredynstlrsvsalpihqhdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpkgsvrapqvyvlpppeeemtkkqvtlcmvtdfmpediyvewtnngktelnykntepvldsdsyfmysklrvekknwvernsyscsvvheglhnhhttkfsrtpgrpqgfgpp (SEQ ID NO:205)    |
| TNT-194 | evqlvqsgaevkkpgasvkvscasgytftsadinwvrqapqglewmggiiifigtanyaqkfqrvtitadeststaymelrslrsedtavyycastavagfdywgqglvtvsSakttapsvyplapvcgdtgssvtlgclvkgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvsstwpsqsitcnvahpasstkvdkkieprgptikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvnnvevhtaqtqthredynstlrsvsalpihqhdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpkgsvrapqvyvlpppeeemtkkqvtlcmvtdfmpediyvewtnngktelnykntepvldsdsyfmysklrvekknwvernsyscsvvheglhnhhttkfsrtpgrpqgfgpp (SEQ ID NO:206)           |
| TNT-195 | evqlvqsgaevkkpgssvkvscasgftfssyaiswvrqapqglewmggiiifigtanyaqkfqrvtitadkststaymelsslrsedtavyycaagydyssgyyhpqpyfydywgqglvtvsSakttapsvyplapvcgdtgssvtlgclvkgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvsstwpsqsitcnvahpasstkvdkkieprgptikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvnnvevhtaqtqthredynstlrsvsalpihqhdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpkgsvrapqvyvlpppeeemtkkqvtlcmvtdfmpediyvewtnngktelnykntepvldsdsyfmysklrvekknwvernsyscsvvheglhnhhttkfsrtpgrpqgfgpp (SEQ ID NO:207) |
| TNT-196 | evqlvesggglvqpqgsrlscaasgftfssyymswirqapkgglewvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnsknlylqmnsraedtavyycassgswylpdywgqglvtvsSakttapsvyplapvcgdtgssvtlgclvkgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvsstwpsqsitcnvahpasstkvdkkieprgptikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvnnvevh  |

|         |   |
|---------|---|
|         | taqtqthredynstlrsvsalpihqhdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpkgsvrapqvylpppee<br>emtkkqvtlcmvtdfmpediyvewtnngktelnykntepvltdsgsyfmysklrvekknwvernsys<br>csvgheglhnhhtksfsrtpgrpqgfgpp (SEQ ID NO:208)  |
| TNT-197 | evqlvqsgggvvpqgrslrlscaasgftfssyamhwvrqapggglewvavisydgsnkyyadsvkgrfti<br>srdnskntlylqmnsraedtavyycaratlqlwlpfdywgqgtlvtsSakttapsvyplapvcgdttgss<br>vtlgclvkgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvsstwpsqsitcnvahpasstkvdkk<br>ieprgptikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvnnve<br>vhtaqtqthredynstlrsvsalpihqhdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpkgsvrapqvylpp<br>peeemtkkqvtlcmvtdfmpediyvewtnngktelnykntepvltdsgsyfmysklrvekknwvern<br>syscsvgheglhnhhtksfsrtpgrpqgfgpp (SEQ ID NO:209) |
| TNT-198 | evqlvqsgaevkkgssvkvscasgftfssyaiswvrqapggglewmgwinpnsnggtnyaqkfqgr<br>vtmtrdtststaymelslrsedtavyycatgyygdlyfydywgqgtlvtsSakttapsvyplapvcgdt<br>gssvtlgclvkgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvsstwpsqsitcnvahpasstkv<br>dkkieprgptikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvn<br>nvevhtaqtqthredynstlrsvsalpihqhdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpkgsvrapqvyl<br>pppeeemtkkqvtlcmvtdfmpediyvewtnngktelnykntepvltdsgsyfmysklrvekknwv<br>ernsyscsvgheglhnhhtksfsrtpgrpqgfgpp (SEQ ID NO:210)   |
| TNT-153 | Evqlvesggglvqpggsrlscaasgftfssynmnwvrqapggglewvsiysssstiyyadsvkgrftisr<br>dnaknslslqmnslrddedtavyycarayygmdivwgqgtvtvssakttapsvyplapvcgdttgssvtlg<br>clvkgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvsstwpsqsitcnvahpasstkvdkkiepr<br>gptikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvnnvevhta<br>qtqthredynstlrsvsalpihqhdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpkgsvrapqvylpppee<br>emtkkqvtlcmvtdfmpediyvewtnngktelnykntepvltdsgsyfmysklrvekknwvernsysc<br>svgheglhnhhtksfsrtpgllqgg (SEQ ID NO: 211)      |

[0364] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, раскрытых в Таблице 14 ниже. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает тяжелую цепь, включающую Q-tag, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, раскрытых в Таблице 15 ниже. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает тяжелую цепь, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, раскрытых в Таблице 15А ниже. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, раскрытых в Таблице 14, и тяжелую цепь, включающую Q-tag, включающую последовательность, выбранную из

группы, состоящей из последовательностей, раскрытых в Таблице 15. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, раскрытых в Таблице 14, и тяжелую цепь, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, раскрытых в Таблице 15А.

Таблица 14

## Легкая цепь человеческого IgG1 антитела к нектину-4

| Антитело            | Последовательность   |
|---------------------|--|
| TNT-201;<br>TNT-413 | divmtqspsslsasvgrvtitcrasqsissylnwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgt<br>dflltisslqpedfatyycqqsystpltfgggkveiKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfy<br>preakvqwkdnalqsgnsqesvteqdskdstyslstltskadyekhkvyacevthqglsspvtks<br>fnrgec (SEQ ID NO:236) |
| TNT-202             | diqltqspsslsasvgrvtitcrasqgisnylawyqqkpgkapklliyaastlqsgvpsrfsqsgsgtdf<br>tltisslqpedfatyycqqsystpytfgggkveiKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypr<br>eakvqwkdnalqsgnsqesvteqdskdstyslstltskadyekhkvyacevthqglsspvtksfn<br>rgec (SEQ ID NO:237) |
| TNT-203             | eivltqspatlspsgeratlsqcrasqvssylawyqqkpgqaprlliydasnratgipdrfsqsgsgtdft<br>ltisslqaedfatyycqqsystfrfggkveiKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypr<br>kvqwkdnalqsgnsqesvteqdskdstyslstltskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnr<br>gec (SEQ ID NO:238)     |
| TNT-204             | eivltqspatlspsgeratlsqcrasqvssylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsqsgsgtdf<br>ltisrlepedfavyyccqynnwtfgggkvdiKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfy<br>preakvqwkdnalqsgnsqesvteqdskdstyslstltskadyekhkvyacevthqglsspvtks<br>fnrgec (SEQ ID NO:239)    |
| TNT-205             | divmtqspsslsasvgrvtitcrasqgisnylawyqqkpgkvpklliyaastlqsgvpsrfsqsgsgt<br>dflltisslqpedvatyycqkynsapytfgggkveiKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnn<br>fypreakvqwkdnalqsgnsqesvteqdskdstyslstltskadyekhkvyacevthqglsspvt<br>ksfnrgec (SEQ ID NO:240) |
| TNT-206             | eivltqspatlspsgeratlsqcrasqvssnlawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsqsgsgtdft<br>ltisrlepedfavyychqygsspltfgggkveiKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypr<br>eakvqwkdnalqsgnsqesvteqdskdstyslstltskadyekhkvyacevthqglsspvtksfn<br>rgec (SEQ ID NO:241) |
| TNT-207;<br>TNT-422 | diqumtqspsslsasvgrvtitcrasqgisnylawfqqkpgkapkllisaasslqsgvpsrfsqsgsgt<br>dflltisslqpedfatyyclqhdspitfgggkveiKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfy  |



|                     |   |
|---------------------|---|
|                     | preakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltskadyekhkvyacevthqglsspvtks<br>fnrgec (SEQ ID NO:242)   |
| TNT-208;<br>TNT-423 | diqmtqspstlsasvgrvtitcrasqgisnylawyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgt<br>dftltisslqpedfatyycqqysystpltfgggkveiKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnfy<br>preakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltskadyekhkvyacevthqglsspvtks<br>fnrgec (SEQ ID NO:243)              |
| TNT-209             | diqmtqspsslsasvgrvtitcrasqdisnylnwyqqkpgkvpklliyaastlqsgvpsrfsqsgsgt<br>dftltisslqpedfatyycqqysystpltfgggkveiKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnfy<br>preakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltskadyekhkvyacevthqglsspvtks<br>fnrgec (SEQ ID NO:244)              |
| TNT-210;<br>TNT-424 | eivltqspgtlslspgeratlscrasqsvssylawyqqkpgqparlliygassratgipdrfsqsgsgtdf<br>tltisrlepedfavyyccqygssltfgggkveiKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnfypr<br>eakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltskadyekhkvyacevthqglsspvtksfn<br>rgec (SEQ ID NO:245)               |
| TNT-211             | divmtqspsslsasvgrvtitcrasqgisnylawyqqkpgkvpklliyaastlqsgvpsrfsqsgsgt<br>efflailslqpedlatyycqqlnshpitfqqgtrleiKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnfy<br>preakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltskadyekhkvyacevthqglsspvtks<br>fnrgec (SEQ ID NO:246)              |
| TNT-154;<br>TNT-212 | diqmtqspssvsasvgrvtitcrasqgisgwlawyqqkpgkapkfliyaastlqsgvpsrfsqsgsgg<br>tdftltisslqpedfatyycqqansfpptfgggkveiKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnn<br>fypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltskadyekhkvyacevthqglsspvt<br>ksfnrgec (SEQ ID NO:247)             |
| TNT-317             | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQFPGTAPK<br>LLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTW<br>DSSLNAGWVFGGGTKLTVLgqpkantvtfppsseelqankatlvclisdfypgavt<br>vawkadgspvkagvettkpskqsnkyaassylstpeqwkshrsyscqvthegstvektvaptec<br>s<br>(SEQ ID NO:1000)   |
| TNT-318             | QTVLTQPSSLSASPGASASLTCTLRSGINVGSYRIYWYQQKPGSPP<br>QFLRLRYKSDSDKQQGSGVPSRFSGSKDDSANAGILLISGLQSEDEA<br>DYCYMIWHSSASVFGTGTKVTVLgqpkantvtfppsseelqankatlvclisdfy<br>pgavtvawkadgspvkagvettkpskqsnkyaassylstpeqwkshrsyscqvthegstvektv<br>aptecs (SEQ ID NO:1001) |
| TNT-320             | QSVLTQSPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWHYQQLPGTAPK   |

|                     |   |
|---------------------|---|
|                     | LLMYGNYQRPSGVPARFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAT<br>WDDSLNGWVFGGGTKVTVLgqpkanptvtfppsseelqankatlvelisdfypgav<br>tvawkadgspvkagvettkpskqsnkyaassylstpeqwkshrsycqvthegstvektvapte<br>cs (SEQ ID NO:1002)   |
| TNT-321             | DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKVPK<br>RLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHS<br>FYPLTFGPGTKVDIKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdn<br>alqsgnsqesvteqdsdstylsstltskadyekhkvacevthqglsspvtksfnrgec (SEQ<br>ID NO:1003)       |
| TNT-322             | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGNNYVSWYQQFPGTAPK<br>LLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTW<br>DSSLSAGVVFGGGTKLTVLgqpkanptvtfppsseelqankatlvelisdfypgavtv<br>awkadgspvkagvettkpskqsnkyaassylstpeqwkshrsycqvthegstvektvaptecs<br>(SEQ ID NO:1004)    |
| TNT-323             | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASMSCRSSQSLAYS DGNTYLNWFQQR<br>PGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGV<br>YYCMQGTHWPLTFGGGKVEIKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfyp<br>reakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsdstylsstltskadyekhkvacevthqglsspvtksf<br>nrgec (SEQ ID NO:1005) |
| TNT-324             | QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGYYPNWFQQKPGQ<br>APRALIYSTSNKHSWTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY<br>CLLYYDGAHLFGGGTKLTVLgqpkanptvtfppsseelqankatlvelisdfypgav<br>tvawkadgspvkagvettkpskqsnkyaassylstpeqwkshrsycqvthegstvektvapte<br>cs (SEQ ID NO:1006)    |
| TNT-327;<br>TNT-425 | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTTSDIGSYNLVSWYQQHPGKAP<br>KLMIYEVSMSPSGVSDRFSGSKSGSTASLTISGLQAEDEADYYCSS<br>YAGSSTVVFGGGTRLTVLgqpkanptvtfppsseelqankatlvelisdfypgavtv<br>wkadgspvkagvettkpskqsnkyaassylstpeqwkshrsycqvthegstvektvaptecs<br>(SEQ ID NO:1007)     |
| TNT-328;<br>TNT-426 | QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSNIGAGYNVHWYQQLPGTA<br>PKVLISGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQ<br>SYDSSLSGSAVFGGGTKLTVLgqpkanptvtfppsseelqankatlvelisdfypga<br>vtvawkadgspvkagvettkpskqsnkyaassylstpeqwkshrsycqvthegstvektvapt<br>ecs (SEQ ID NO:1008)  |

|                     |  |
|---------------------|--|
| TNT-330             | DIVMTQTPLSLPVTGEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKP<br>GQSPQLLIYTLASYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKVS RVEAEDVGV<br>YYCMQRIEFPYTFGQGTKLEIKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnfypre<br>akvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslstltskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnr<br>gec (SEQ ID NO:1009) |
| TNT-331             | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPK<br>LLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTW<br>DTSLSGWLFGGGTKLTVLgqpkantvtfppsseelqankatlvclisdfypgavtv<br>awkadgspvkagvettkpskqsnnyaassylstpeqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs<br>(SEQ ID NO:1010)       |
| TNT-332             | DIQLTQSPSFLSASVGDKVTITCRASQGINSYLAWYQQKPGKAPKL<br>LIYSASTLQGGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPADFATYCCQQLNS<br>YPFTFGPGTKVDIKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnfypreakvqwkvdnal<br>qsgnsqesvteqdskdstyslstltskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec (SEQ ID<br>NO:1011)         |
| TNT-333;<br>TNT-427 | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPK<br>LLISDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTW<br>DSSLSAGVVFGGGTKLTVLgqpkantvtfppsseelqankatlvclisdfypgavtv<br>awkadgspvkagvettkpskqsnnyaassylstpeqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs<br>(SEQ ID NO:1012)      |
| TNT-334             | EIVMTQSPATLPVSPGERATLSCRASQSVSINLAWYQQKPGQAPR<br>LLIYGVSTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISGLQSEDFAVYYCQQYN<br>NWPRTFGQGTKVEIKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnfypreakvqwkvd<br>nalqsgnsqesvteqdskdstyslstltskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec (SEQ<br>ID NO:1013)         |
| TNT-335             | QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSDYIYWYQQLPGTAPK<br>LLIYSNHQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAW<br>EDSLSGPIFGGGTKLTVLgqpkantvtfppsseelqankatlvclisdfypgavtvaw<br>kadgspvkagvettkpskqsnnyaassylstpeqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs<br>(SEQ ID NO:1014)       |
| TNT-336             | QLVLTQSPSASASLGASVKLCTLSGHSFYAIAWHQQQPEKGPR<br>YLMQVNSNGSHNKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADY<br>YCQSWDTDIWVFGGGTKLTVLgqpkantvtfppsseelqankatlvclisdfypg<br>avtvawkadgspvkagvettkpskqsnnyaassylstpeqwkshrsyscqvthegstvektvap<br>tecs (SEQ ID NO:1015)        |

|                     |   |
|---------------------|---|
| TNT-337             | DIVMTQTPLSLPVTGEPASISCRSSQSIVHSNANTYLEWYLQKPG<br>QSPQLLIYKVS NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY<br>CFQGSHVPYTFGGGTKVEIKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreak<br>vqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslstltskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrge<br>c (SEQ ID NO:1016) |
| TNT-412;<br>TNT-414 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL<br>LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYS<br>TPLTFGQGTKVEIKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnal<br>qsgnsqesvteqdskdstyslstltskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec (SEQ ID<br>NO:1017)        |
| TNT-417;<br>TNT-428 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPK<br>LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY<br>STPLTFGGGTKVEIKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdn<br>alqsgnsqesvteqdskdstyslstltskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec (SEQ<br>ID NO:1018)        |
| TNT-418;<br>TNT-429 | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTTSDIGSYNLVSWYQQHPGKAP<br>KLMIYEVSMSPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSS<br>YAGSSTVVFGGGTRLTVLgqpkanptvtfppsseelqankatlvelisdfypgavtva<br>wkadgspvkagvettkpskqsnkyaassylstpeqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs<br>(SEQ ID NO:1019)       |
| TNT-419;<br>TNT-430 | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTTSDIGSYNLVSWYQQHPGKAP<br>KLMIYEVSMSPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSS<br>YAGSSTVVFGGGTRLTVLgqpkanptvtfppsseelqankatlvelisdfypgavtva<br>wkadgspvkagvettkpskqsnkyaassylstpeqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs<br>(SEQ ID NO:1020)       |
| TNT-420;<br>TNT-431 | QSVLTQPPSVS GAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTA<br>PKLLIYGNSNRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQ<br>SYDSSLSGSAVFGGGTKLTVLgqpkanptvtfppsseelqankatlvelisdfypga<br>vtvawkadgspvkagvettkpskqsnkyaassylstpeqwkshrsyscqvthegstvektvapt<br>ecs (SEQ ID NO:1021)  |
| TNT-421;<br>TNT-432 | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPK<br>LLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTW<br>DSSLSAGVVFGGGTKLTVLgqpkanptvtfppsseelqankatlvelisdfypgavtva<br>wkadgspvkagvettkpskqsnkyaassylstpeqwkshrsyscqvthegstvektvaptecs<br>(SEQ ID NO:1022)      |

## Тяжелая цепь с Q-tag человеческого IgG1 антитела к нектину-4

| Антитело        | Последовательность   |
|-----------------|--|
| TNT-201 с Q-tag | evqlvqsgaevkpkpgssvkvscasgyftgyymhwvrqapggglewmgwinpnsngtnyaq<br>kfqgrvtmtrdtsistaymelrslrsddtavyyycargsalhffgvdwywgqglvtvsSastkgpsvfp<br>lapsskstsggtaalglvkdypvvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqt<br>yicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvv<br>dvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkal<br>papiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttp<br>pvl dsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ<br>ID NO:224)  |
| TNT-202 с Q-tag | evqlvqsgaevkpkpgssvkvscasggfssyaiswvrqapggglewmggiipifgtanyaqkfq<br>grvtitadeststaymelsslrsedtavyyycargysssweypyfdywgqglvtvsSastkgpsvfp<br>lapsskstsggtaalglvkdypvvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqt<br>yicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvv<br>dvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkal<br>papiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttp<br>pvl dsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ<br>ID NO:225) |
| TNT-203 с Q-tag | evqlvqsggglvkpggslrlscaasgffsdyymwvrqapggglewvsaisgsggstyyadsvkg<br>rftisrdnsknlylqmnsraedtavyycardegyyymdvwgkgtvtvsSastkgpsvflapss<br>kstsggtaalglvkdypvvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicnv<br>nhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsh<br>edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapie<br>ktiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttpvl ds<br>dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID<br>NO:226)           |
| TNT-204 с Q-tag | evqllesgggvvqpgrslrlscaasgffsdyymhwvrqapggglewvavisydgsnkyadsvk<br>grftisrdnsknlylqmnsraedtavyycakssyydyvwsyrytdafdiwgqgtmvtvsSastk<br>gpsvflapsskstsggtaalglvkdypvvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpss<br>slgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpe<br>vtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykck<br>vsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpen<br>nykttpvl dsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqgfgpp<br>(SEQ ID NO:227) |

|                 |  |
|-----------------|--|
| TNT-205 c Q-tag | evqllesgggvvqpgrslrlscaasgftfssygmhwwrqapgkglewvavisydgsnkyyadvk<br>grftisrdnsntlylqmnsraedtavyycaakdygynwnffdywgqgtlvtsSastkgpsvfpla<br>psskstsggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqyti<br>cnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvd<br>vshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalp<br>apiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttpp<br>vldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID<br>NO:228)          |
| TNT-206 c Q-tag | qvqlqesgpglvkpsgtlslctvsggsissggywawirpppgkglewigiyytgstyynpslksr<br>vtiyvdtsknqfslklssvtaadtavyycardpfpeppdafdiwgqgtmvtvsSastkgpsvfplaps<br>skstsggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqyti<br>cnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvs<br>hedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpap<br>iektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvl<br>dsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID<br>NO:229)        |
| TNT-207 c Q-tag | evqlvqsgaevkkpgasvkvscasgytftsdydinwwrqapgqglewmggiipifgtanyaqkfq<br>grvtitadeststaymelrslrsedtavyycaastavagfgidywgqgtlvtsSastkgpsvfplapsk<br>stsggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqyti<br>cnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvs<br>hedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapie<br>ktiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds<br>dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID<br>NO:230)         |
| TNT-208 c Q-tag | evqlvqsgaevkkpgssvkvscasggtfssyaiswwrqapgqglewmggiipifgtanyaqkfq<br>grvtitadkststaymelsslrsedtavyycaagyydssgyyhqpyfydywgqgtlvtsSastkg<br>psvfplapskstsggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpss<br>lgtqyti<br>cnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevt<br>cvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvs<br>nkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpenn<br>ykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp<br>(SEQ ID NO:231) |
| TNT-209 c Q-tag | evqlvesggglvqpqgsrlrlscaasgftfsdymswirqapgkglewvsgiswngsigyadvk<br>grftisrdnsntlylqmnsraedtavyycaassgswylpldywgqgtlvtsSastkgpsvfplapsk<br>stsggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqyti<br>cnv  |

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
|                                     | <p>hkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshe<br/>dpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapie<br/>ktiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds<br/>dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslspsgrpqgfgpp (SEQ ID<br/>NO:232)</p>   |
| TNT-210 c Q-tag                     | <p>evqlvqsgggvvpgrslrlscaasgftfssyamhwvrqapkgglewvavisydgsnkyyadsvk<br/>grftisrdnsntlylqmnsraedtavyyaratlqlwplfdywgqgtlvtvsSastkgpsvfplaps<br/>skstsggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicn<br/>vnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvs<br/>hedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpap<br/>iektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvl<br/>dsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslspsgrpqgfgpp (SEQ ID<br/>NO:233)</p>      |
| TNT-211 c Q-tag                     | <p>evqlvqsgaevkkpgssvkvscasgftfssyaiswvrqapggglewmgwinpnsngtnyaqkf<br/>qgrvtmtrdtststaymelsslrstedtavyyatgyygdlyfydywgqgtlvtvsSastkgpsvfpla<br/>psskstsggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyi<br/>cnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvd<br/>vshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpap<br/>apiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttpp<br/>vldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslspsgrpqgfgpp (SEQ ID<br/>NO:234)</p> |
| TNT-154 c Q-tag;<br>TNT-212 c Q-tag | <p>evqlvesggglvqpgslrlscaasgftfssynmnwvrqapkgglewvsiyssstiyadsvkgr<br/>ftisrdnaknslslqmnsrldedtavyyarayyygmdvwgqgtvtvsSastkgpsvfplapsks<br/>tsggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvn<br/>kpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshed<br/>pevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapiekt<br/>iskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds<br/>dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslspsgrpqgfgpp (SEQ ID<br/>NO:235)</p>             |
| TNT-317 c Q-tag                     | <p>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQPPGKGLE<br/>WIGYIYYSNTNYNPSLKSRVTISVDMSKNQFSLRLSSVTAADTA<br/>VYYCARDFHHDGSA YRWYFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsk<br/>stsggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvn<br/>hkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshe<br/>dpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapie</p>   |

|                 |   |
|-----------------|---|
|                 | ktiskakgqprepqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds<br>dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID<br>NO:1030)   |
| TNT-318 c Q-tag | QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSNYWTWIRQSAGKGL<br>EWIGRIHISESTNYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA<br>VYFCAREGEWKVLGAFDIWGQGTMTVTVSSastkgpsvflapsskstsggta<br>algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt<br>kvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf<br>nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak<br>gqprepqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds<br>dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1031)    |
| TNT-320 c Q-tag | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFTVYYIHWVRQAPGQ<br>GLEWMGWISPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELTRLR<br>SDDTAIFYCARQTVVTPNWGFDYWGQGLVTVTVSSastkgpsvflapssk<br>stsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnv<br>hkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshe<br>dpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapie<br>ktiskakgqprepqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds<br>dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID<br>NO:1032) |
| TNT-321 c Q-tag | QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIYYSGNVNYNPSLKSRVTISVDASKNQFSLKLTSVTAADTA<br>VYYCAIGGVGAQWDAFDIWGQGTMTVTVSSastkgpsvflapsskstsggta<br>algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt<br>kvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf<br>nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak<br>gqprepqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds<br>dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1033)    |
| TNT-322 c Q-tag | QVQLQESGPGGLVKPSATLSLTCTVSGGSISSYYWNWIRQPPGKGL<br>EWIGYIYYSGNTNYNPSLKSRVTISVDMASKNQFSLKLNSVTAADT<br>AVYYCARSESYGYWFFYLWGRGTLVTVTVSSastkgpsvflapsskstsggtaa<br>lgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntk<br>vdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfn<br>wyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakg<br>qprepqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds<br>dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1034)   |



|                 |   |
|-----------------|---|
|                 | kltvdkswqqgnvfscsvmhcalhnhytqkslspsgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1034)   |
| TNT-323 c Q-tag | QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYFWNWIRQPPGKGLE<br>WIGYLYYIGTTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTA<br>VYYCARSIGNYNDADFIDWGQGTMTVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaal<br>gclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavllqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkv<br>dkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnw<br>yvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqp<br>repqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysklt<br>vdkswqqgnvfscsvmhcalhnhytqkslspsgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1035)  |
| TNT-324 c Q-tag | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFIHWVRQAPGQG<br>LEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRLS<br>DDTAVYYCARDTFYFYYGMDVWGQGTITVTVSSastkgpsvfplapssks<br>tsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavllqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnh<br>kpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshed<br>pevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiekt<br>iskakgqprepqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsd<br>gsfflyskltvdkswqqgnvfscsvmhcalhnhytqkslspsgrpqgfgpp (SEQ ID<br>NO:1036) |
| TNT-327 c Q-tag | QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYFWNWIRQPPGKGLE<br>WIGRIYTTGGAKYNPSLKSRVTMSIDTSKNNFSLKLSSVTAADTA<br>VYFCARDRNWEWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaal<br>clvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavllqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkv<br>dkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwy<br>yvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqpr<br>epqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltv<br>dkswqqgnvfscsvmhcalhnhytqkslspsgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1037)      |
| TNT-328 c Q-tag | QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSMSSYFWSWIRQPPERGL<br>EWVGYMYSGNTNYPNPSLKSRVTTSIDTSKNQFSLKLTSVTAADT<br>AVYYCARSIGNFYWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaal<br>gclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavllqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkv<br>dkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnw<br>yvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqp<br>repqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysklt<br>vdkswqqgnvfscsvmhcalhnhytqkslspsgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1038)     |
| TNT-330 c Q-tag | EVQLVESGGGLVKGSSLRSLCAVSGFTFSSYNMNWVRQAPGKG   |

|                 |  |
|-----------------|--|
|                 | LEWVSSISISSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAED<br>TAVYYCARDRLDDAFDIWGQGTVVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaa<br>lgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntk<br>vdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfn<br>wyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapiektiskakg<br>qprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsffly<br>kltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1039)   |
| TNT-331 c Q-tag | QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYWSWIRQPAGKGL<br>EWIGRIYTSGSTNYNPSLKSRTMSVDTSKNRSLKLSVTAADT<br>AVYYCAKENWGPSFDYWGQGTLLTVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalg<br>clvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvd<br>kkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwy<br>vdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapiektiskakgqpr<br>epqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltv<br>dksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1040)     |
| TNT-332 c Q-tag | QVQLVQSGAEAKKPGASVRV SCKTSGYTFTNYIHWVRQAPGQG<br>LEWMGIINPTLDSTSYAQKFQDRVTMTRDTSTNTDYMDLSSLRFE<br>DTAVYYCARSAGFDAFDIWGQGTMTVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaa<br>lgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntk<br>vdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfn<br>wyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapiektiskakg<br>qprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsffly<br>kltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp<br>(SEQ ID NO:1041) |
| TNT-333 c Q-tag | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTISGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIFYIGNTNYYPSLKSRTISVDASKNQFSLKLSVTAADTAV<br>YYCARSYPYWFYFDLWGRGTLTVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvk<br>dyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkv<br>epkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br>vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapiektiskakgqprep<br>vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdks<br>rwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1042)     |
| TNT-334 c Q-tag | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMHWVRQAPGK<br>GLVWVSRINSDGSSSNYADSVKGRFTFSRDNANKNTLYLQMNSLR<br>AEDTAVYFCVRDNWYFDYWGQGTLLTVTVSSastkgpsvfplapsskstsggta   |

|                 |   |
|-----------------|---|
|                 | <p>algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqytyicnvnhkpsnt<br/> kvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf<br/> nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalspapiektiskak<br/> gqprepqvylppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsffly<br/> skltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqgfgpp<br/> (SEQ ID NO:1043)</p>  |
| TNT-335 c Q-tag | <p>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br/> WIGYIHYSIGISNYNPSLKS RVAISLDTSNHFLSLKLTSLTAADTAV<br/> YFCARGSYWFDPWGQGTLVTVSSastkgpsvflapssksts ggtaalgclvkdyf<br/> pepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqytyicnvnhkpsntkvdkkvepk<br/> scdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvev<br/> hnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalspapiektiskakgqprepqvyl<br/> ppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrwq<br/> qgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1044)</p>        |
| TNT-336 c Q-tag | <p>KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSNYWMHWVRQVPGE<br/> GLVWVSRLNNGGTSTRYADSVKSRFTISRDNANKNTLYLQMNSLR<br/> AEDTAVYYCVRDWFYFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvflapssksts ggtaal<br/> gclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqytyicnvnhkpsntkv<br/> dkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnw<br/> yvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalspapiektiskakgq<br/> repqvylppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflysklt<br/> vdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1045)</p>          |
| TNT-337 c Q-tag | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMSWVRQAPGKG<br/> LEWVATISSGGSYTYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE<br/> DTAVYYCARQELGSYYAMDYWGQGTTLVTVSSastkgpsvflapssksts<br/> ggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqytyicnvnhk<br/> psntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpe<br/> vkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalspapiektis<br/> kakgqprepqvylppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsds<br/> fflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID<br/> NO:1046)</p> |
| TNT-412 c Q-tag | <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ<br/> GLEWMGWINPNSGGTNYA QKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRL<br/> SDDTAVYYCARGSALHFFGVFDYWGQGTTLVTVSSastkgpsvflapss<br/> ksts ggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqytyicnv</p>   |

|                 |  |
|-----------------|--|
|                 | nhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsh<br>edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapie<br>ktiskakgqprepqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds<br>dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqfgpp (SEQ ID<br>NO:1047)   |
| TNT-417 c Q-tag | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG<br>LEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED<br>TAVYYCAAGYYYDSSGYYHQYYFDYWGQGLTVTVSSastkgpsvf<br>plapsskstsggtaalgclvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtq<br>tyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvv<br>vdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapie<br>ktiskakgqprepqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennyktt<br>ppvlds dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqfgpp (SEQ<br>ID NO:1048) |
| TNT-418 c Q-tag | QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYYWIWIRQPAGKGLE<br>WIGRIYTTGGAKYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA<br>VYFCARDRNWEWNFDLWGRGTLTVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalg<br>clvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvd<br>kkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwy<br>vdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapiektiskakgqpr<br>epqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds dgsfflyskltv<br>dksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqfgpp (SEQ ID NO:1049)          |
| TNT-419 c Q-tag | QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYYWSWIRQPAGKGL<br>EWIGRIYTTGGAKYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADT<br>AVYYCARDRNWEWNFDLWGRGTLTVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaa<br>lgclvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntk<br>vdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfn<br>wyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapiektiskakg<br>qprepqvylppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds dgsfflysk<br>ltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgrpqfgpp (SEQ ID NO:1050)          |
| TNT-420 c Q-tag | QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSMSSYFWSWIRQPPGKGL<br>EWIGYMYYSNTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT<br>AVYYCARGNFYWNFDLWGRGTLTVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalg<br>clvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkv<br>dkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnw  |

|                 |  |
|-----------------|--|
|                 | yvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqp<br>repqvylppsreemtknqvsltlclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflysklt<br>vdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1051)  |
| TNT-421 c Q-tag | QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIFYIGNTNYPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV<br>YYCARSYPYWYFDLWGRGTLTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvk<br>dyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqytyicnvnhkpsntkvdkkv<br>epkscdkthtccppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br>vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqp<br>repqvylppsreemtknqvsltlclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdks<br>rwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1052)              |
| TNT-413 c Q-tag | EVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSCKASGYTFTGYMHVWRQAPGQ<br>GLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELRSLR<br>SDDTAVYYCARGSALHFFGVFDYWGQGTLTVSSastkgpsvfplapss<br>kstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqytyicnv<br>nhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsh<br>edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapie<br>ktiskakgqp<br>repqvylppsreemtknqvsltlclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds<br>dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID<br>NO:1053) |
| TNT-422 c Q-tag | EVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG<br>LEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELRSLRSED<br>TAVYYCASTAVAGFGIDYWGQGTLTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaa<br>lgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqytyicnvnhkpsntk<br>vdkkvepkscdkthtccppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfn<br>wyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakg<br>qp<br>repqvylppsreemtknqvsltlclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflysk<br>ltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1054)       |
| TNT-423 c Q-tag | EVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIWVRQAPGQG<br>LEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED<br>TAVYYCAAGYYYDSSGYHQPYYFDYWGQGTLTVSSastkgpsvf<br>plapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtq<br>tyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvv<br>vdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnka<br>lpapiektiskakgqp<br>repqvylppsreemtknqvsltlclvkgfypsdiavewesngqpennyktt   |

|                 |  |
|-----------------|--|
|                 | ppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslsispgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1055)   |
| TNT-424 c Q-tag | EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGL<br>LEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA<br>EDTAVYYCARATLQLWLPLFDYWGQGLVTVSSastkgpsvfplapssks<br>tsggtaalglvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnh<br>kpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshed<br>pevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk alpapiekt<br>iskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsd<br>gsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslsispgrpqgfgpp (SEQ ID<br>NO:1056) |
| TNT-425 c Q-tag | QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYWIWIRQPAGKGLE<br>WIGRIYTTGGAKYNPSLKS RVTMSIDTSKNNFSLKLSSVTAADTA<br>VYFCARDRNWEWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapssksts gggtaal<br>glvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkv<br>dkkvepkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfn<br>wyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk alpapiektiskakgq<br>prepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysklt<br>vdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslsispgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1057)     |
| TNT-426 c Q-tag | QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSMSSYFWSWIRQPPERGL<br>EWVGYMYYS GNTNYPNPSLKS RVTTSIDTSKNQFSLKLTSVTAADT<br>AVYYCARS GNFYWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapssksts gggtaal<br>glvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkv<br>dkkvepkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfn<br>wyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk alpapiektiskakg<br>qprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsffly<br>skltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslsispgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1058) |
| TNT-427 c Q-tag | QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTISGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIFYIGN TNYYPSLKS RVTISVDASKNQFSLKLSSVTAADTAV<br>YYCARSYPYWYFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapssksts gggtaalglvk<br>dyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br>vepkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvd<br>gvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk alpapiektiskakgq<br>prepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysklt<br>vdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslsispgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1059)    |

|                 |   |
|-----------------|---|
| TNT-414 c Q-tag | <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQ<br/> GLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLR<br/> SDDTAVYYCARGSALHFFGVFDYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapss<br/> kstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglylssvvtvpssslgtqtyicnv<br/> nhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsh<br/> edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapie<br/> ktiskakgqprepqvylppsreemtknqvslclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvlds<br/> dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqfgpp (SEQ ID<br/> NO:1060)</p>      |
| TNT-428 c Q-tag | <p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG<br/> LEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED<br/> TAVYYCAAGYYYDSSGYYHQYYFDYWGQGTLVTVSSastkgpsvf<br/> plapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglylssvvtvpssslgtq<br/> tyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvv<br/> vdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnka<br/> lpapiektiskakgqprepqvylppsreemtknqvslclvkgyfypsdiavewesngqpennyktt<br/> ppvlds dgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqfgpp (SEQ<br/> ID NO:1061)</p> |
| TNT-429 c Q-tag | <p>QVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYYWIWIRQPAGKGLE<br/> WIGRIYTTGGAKYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA<br/> VYFCARDRNWEWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalg<br/> clvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglylssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkv<br/> dkkvepkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnw<br/> yvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgq<br/> repqvylppsreemtknqvslclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvlds dgsfflysklt<br/> vdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqfgpp (SEQ ID NO:1062)</p>             |
| TNT-430 c Q-tag | <p>QVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYYWSWIRQPAGKGL<br/> EWIGRIYTTGGAKYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADT<br/> AVYYCARDRNWEWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaa<br/> lgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglylssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntk<br/> vdkkvepkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfn<br/> wyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakg<br/> qprepqvylppsreemtknqvslclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvlds dgsffly<br/> skltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqfgpp (SEQ ID NO:1063)</p>            |
| TNT-431 c Q-tag | <p>QVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSMSSYFWSWIRQPPGKGL</p>   |

|                 |  |
|-----------------|--|
|                 | EWIGYMYYSGNTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT<br>AVYYCARSGNFYWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapssksts ggtaal<br>gclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkv<br>dkkvepkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfn<br>wyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakg<br>qprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflysk<br>kltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1064)  |
| TNT-432 с Q-таг | QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIFYIGNTNYPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV<br>YYCARSYPYWYFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapssksts ggtaalgclvk<br>dyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkk<br>vepkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvd<br>gvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprep<br>vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvd<br>ksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgrpqgfgpp (SEQ ID NO:1065) |

Таблица 15А

## Тяжелая цепь человеческого IgG1 антитела к нектину-4

| Антитело | Последовательность  |
|----------|---|
| TNT-201  | evqlvqsgaevkkpgssvkvscasgytftgyymhwvrqapggglewmgwinpns ggtnyaqk<br>fqgrvtmtrdtsistaymelrslrsddtavyycargsalhffgvfdywgqgtlvtsSastkgpsvfplap<br>ssksts ggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicn<br>vnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsh<br>edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapie<br>ktiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsds<br>fflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1070)  |
| TNT-202  | evqlvqsgaevkkpgssvkvscasggftssyaiswvrqapggglewmggiipifgtanyaqkfqgr<br>vtitadeststaymelsslrsedtavyycargysssweypyfydywgqgtlvtsSastkgpsvfplap<br>ssksts ggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicn<br>vnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsh<br>edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapie<br>ktiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsds<br>fflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1071) |
| TNT-203  | evqlvqsggglvkggslrlscaasgftfsdyymwvrqapggglewvsaisgggstyyadsvkgr<br>ftisrdnsntlylqmnsraedtavyycardegyyymdvwkggtvtvsSastkgpsvfplapssk<br>stsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicvnhk   |



|         |  |
|---------|--|
|         | psntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1072)   |
| TNT-204 | evqllesgggvvqpgrslrlscaasgftfssygmhwwvrqapggglewvavisydgsnkyyadsvkgrftisrdnsntlylqmnsraedtavyycakssyydyvwgsyrytdafdiwgqgtmvtvsSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1073) |
| TNT-205 | evqllesgggvvqpgrslrlscaasgftfssygmhwwvrqapggglewvavisydgsnkyyadsvkgrftisrdnsntlylqmnsraedtavyycakdygynwnffdywgqgtlvtvsSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1074)         |
| TNT-206 | qvqlqesgpglvkpsgtlslctctvsggsissggyywwawirppgkglewigsiyytgstyynpslksrvtiyvdtksknqfslklssvtaadtavyycardpfpeppdafdiwgqgtmvtvsSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1075)    |
| TNT-207 | evqlvqsgaevkkpgasvkvscasgytftsdydinwwvrqapggglewmggiipifgtanyaqkfqgrvtitadeststaymelrslrsedtavyycastavagfgidywgqgtlvtvsSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1076)        |
| TNT-208 | evqlvqsgaevkkpgssvkvscasggtfssyaiswwvrqapggglewmggiipifgtanyaqkfqgrvtitadkstaymelsslrsedtavyycagyydyssgyyhpqyyfydywgqgtlvtvsSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglyslssvvtvpssslgtqt   |

|                     |  |
|---------------------|--|
|                     | <p>yicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1077)</p>   |
| TNT-209             | <p>evqlvesggglvqpqgsrlscaasgftfsdymswirqapggglewvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnsntlylqmnsraedtavyyccassgswylpdywgqgtlvtsSastkgpsvfplapsskstsggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqytyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1078)</p>     |
| TNT-210             | <p>evqlvqsgggvvpqgrsrlscaasgftfsyamhwvrqapggglewvavisdydgnkyyadsvkgrftisrdnsntlylqmnsraedtavyyccaratlqlwlpfdywgqgtlvtsSastkgpsvfplapsskstsggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqytyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1079)</p>   |
| TNT-211             | <p>evqlvqsgaevkkpvgssvkvscasgftfsyaiswvrqapggglewmgwinpnsngtynyaqkfqgrvtmtrdtststamelslrsedtavyycatgyygdlyyfdywgqgtlvtsSastkgpsvfplapsskstsnggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqytyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1080)</p> |
| TNT-154;<br>TNT-212 | <p>evqlvesggglvqpqgsrlscaasgftfsynmnwvrqapggglewvsiysssstiyyadsvkgrftisrdnaknslslqmnslrddedtavyyccarayygmdivwgqgtvtvsSastkgpsvfplapsskstsggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqytyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1081)</p>    |
| TNT-317             | <p>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQPPGKGLE<br/>WIGYIYYSGNTNYNPSLKSRTVISVDMSKNQFSLRLSSVTAADTAV<br/>YYCARDFFHHYDGSAYRWYFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapssksts</p>   |

|         |  |
|---------|--|
|         | <p>ggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1082)</p>  |
| TNT-318 | <p>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSNYWTWIRQSAGKGLE<br/>WIGRIHISESTNYPNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY<br/>FCAREGEWKVLGAFDIWGQGTMTVTVSSastkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1083)</p> |
| TNT-320 | <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTVYYIHWVRQAPGQGLEW<br/>MGWISPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELTRLRSD<br/>DTAIFYCARQTVVTPNWGFDYWGGTLTVTVSSastkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1084)</p>   |
| TNT-321 | <p>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br/>WIGYIYYSGNVNYPNPSLKSRVTISVDASKNQFSLKLTSVTAADTAV<br/>YYCAIGGVGAQWDAFDIWGQGTMTVTVSSastkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1085)</p> |
| TNT-322 | <p>QVQLQESGPGGLVKPSATLSLTCTVSGGSISSYYWNWIRQPPGKGLE<br/>WIGYIYYSGNTNYPNPSLKSRVTISVDMASKNQFSLKLNSVTAADTAV<br/>YYCARSESYGYWFFYLWGRGTLTVTVSSastkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv</p>  |

|         |  |
|---------|--|
|         | ytllpsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrw<br>qqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1086)  |
| TNT-323 | QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGGSISSYFWNWIRQPPGKGLE<br>WIGYLYYIGTTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNVTAAADTAV<br>YYCARSGNYNDADFIDWGGQTMVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgcl<br>vkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkk<br>vepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br>vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv<br>ytllpsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrw<br>qqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1087) |
| TNT-324 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFIHWVRQAPGQG<br>LEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSD<br>DTAVYYCARDTFYYYYGMDVWGQGTITVTVSSastkgpsvfplapsskstsg<br>gtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkps<br>ntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkf<br>nwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakg<br>qprepqvylpsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysk<br>ltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1088)   |
| TNT-327 | QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGGSISSYFWNWIRQPPGKGLE<br>WIGRIYTTGGAKYNPSLKSRTMSIDTSKNNFSLKLNVTAAADTAV<br>YFCARDRNWENFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclv<br>kdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkk<br>vepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br>vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv<br>ylpsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrw<br>qqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1089)      |
| TNT-328 | QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGGSMSSYFWSWIRQPPERGLE<br>WVGYYMYSGNTNYPNPSLKSRTTIDTSKNQFSLKLNVTAAADTA<br>VYYCARSGNFYWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgcl<br>vkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkk<br>vepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br>vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv<br>ytllpsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrw<br>qqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1090)   |
| TNT-330 | EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAVSGFTFSSYMNWVRQAPGKGL   |

|         |  |
|---------|--|
|         | <p>EWVSSISISSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA<br/> VYYCARDRLDDAFDIWGQGTVVTVSSastkgpsvflapsskstsggtaalgc<br/> vkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br/> vepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br/> vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv<br/> ytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrw<br/> qqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1091)</p>  |
| TNT-331 | <p>QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYWSWIRQPAGKGLE<br/> WIGRIYTSGSTNYNPSLKSRTMSVDTSKNRSLKLSSVTAADTAV<br/> YYCAKENWGPSFDYWGQGTLLTVTVSSastkgpsvflapsskstsggtaalgc<br/> lvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br/> vepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br/> vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv<br/> ytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrw<br/> qqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1092)</p>   |
| TNT-332 | <p>QVQLVQSGAEAKKPGASVRVSCKTSGYTFTNYYIHWVRQAPGQG<br/> LEWMGIINPTLDSTSYAQKFQDRVTMTRDTSTNTDYMDLSSLRFED<br/> TAVYYCARSAGFDAFDIWGQGTMTVTVSSastkgpsvflapsskstsggtaalgc<br/> lvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br/> vepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br/> vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv<br/> ytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrw<br/> qqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1093)</p> |
| TNT-333 | <p>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTISGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEW<br/> IGYIFYIGNTNYYPSLKSRTISVDASKNQFSLKLSSVTAADTAVYY<br/> CARSYPYWFYFDLWGRGTLTVTVSSastkgpsvflapsskstsggtaalgc<br/> lvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br/> vepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br/> vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv<br/> ytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrw<br/> qqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1094)</p>  |
| TNT-334 | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMHWVRQAPGKGL<br/> LVWVSRINSDGSSSNYADSVKGRFTFSRDNAKNTLYLQMNSLRAE<br/> DTAVYFCVRDNWYFDYWGQGTLLTVTVSSastkgpsvflapsskstsggtaalgc<br/> lvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk</p>   |

|         |   |
|---------|---|
|         | vepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br>vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv<br>ytlppsreemtqnqvsitclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrw<br>qqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1095)   |
| TNT-335 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIHYSGISNYNPSLKS RVAISLDTSNNHFSLKLTSLTAADTAVY<br>FCARGSYWFDPWGQGLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalglvkdyp<br>pevtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdk<br>thtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnakt<br>kpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsreem<br>tqnqvsitclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscs<br>vmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1096)     |
| TNT-336 | KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSNYWMHWVRQVPGE<br>GLVWVSRLNNGGTSTRYADSVKSRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE<br>DTAVYYCVRDWFYDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalglv<br>kdyfpevtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br>vepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br>vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv<br>ytlppsreemtqnqvsitclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksr<br>wqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1097)     |
| TNT-337 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYDMSWVRQAPGKGL<br>EWWATISSGGSYTYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED<br>TAVYYCARQELGSYYAMDYWGQGT VTVSSastkgpsvfplapsskstsgg<br>taalglvkdyppevtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkps<br>ntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevk<br>fnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakg<br>qprepqvylppsreemtqnqvsitclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysk<br>ltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1098) |
| TNT-412 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHWVRQAPGQ<br>GLEWMGWINPNSGGTNYA QKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRS<br>DDTAVYYCARGSALHFFGVFDYWGQGLVTVSSastkgpsvfplapsskst<br>sggtaalglvkdyppevtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnh<br>kpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpe<br>vkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak<br>gqprepqvylppsreemtqnqvsitclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsffly   |

|         |   |
|---------|---|
|         | kltdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslsisp (SEQ ID NO:1099)  |
| TNT-417 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL<br>EWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDT<br>AVYYCAAGYYDSSGYYHQPFYFDYWGQGLVTVSSastkgpsvfpla<br>psskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyic<br>nvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvs<br>hedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk alpapie<br>ktiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvlds<br>gsfflyskltdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslsisp (SEQ ID NO:1100) |
| TNT-418 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYWIWIRQPAGKGLE<br>WIGRIYTTGGAKYNPSLKS RVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV<br>YFCARDRNWEWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclv<br>kdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br>epkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br>evhnaktkpreeqnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk alpapiektiskakgqprepvyt<br>lppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltdksrw<br>qqgnvfscsvmhealthnhytqkslsisp (SEQ ID NO:1101)          |
| TNT-419 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYYSWIRQPAGKGLE<br>WIGRIYTTGGAKYNPSLKS RVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV<br>YYCARDRNWEWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclv<br>kdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br>epkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br>evhnaktkpreeqnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk alpapiektiskakgqprepvyt<br>lppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltdksrw<br>qqgnvfscsvmhealthnhytqkslsisp (SEQ ID NO:1102)          |
| TNT-420 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSMSSYFWSWIRQPPGKGLE<br>WIGYMYSGNTNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV<br>YYCARSGNFYWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclv<br>kdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br>epkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br>evhnaktkpreeqnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk alpapiektiskakgqprepvyt<br>lppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltdksrw<br>qqgnvfscsvmhealthnhytqkslsisp (SEQ ID NO:1103)          |
| TNT-421 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYYSWIRQPPGKGLE<br>WIGYIFYIGNTYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY   |

|         |  |
|---------|--|
|         | YCARSYPYWYFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalglvkdyl<br>pepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepks<br>cdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhn<br>aktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlpps<br>reemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgn<br>vfscsvmhealhnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1104)   |
| TNT-413 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTGYMHWRQAPGQG<br>LEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELRSLRSD<br>DTAVYYCARGSALHFFGVFDYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsg<br>gtaalglvkdylpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicvnhkps<br>ntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevk<br>fnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakg<br>qprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysk<br>ltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1105)     |
| TNT-422 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGL<br>EWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELRSLRSEDT<br>AVYYCASTAVAGFGIDYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgl<br>vkdylpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkk<br>vepkscdkthtcppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvd<br>gvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprep<br>vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksr<br>wqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1106)      |
| TNT-423 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAIWVRQAPGQGL<br>EWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDT<br>AVYYCAAGYYYDSSGYYHQPYFDYWGQGTLVTVSSastkgpsvfla<br>psskstsggtaalglvkdylpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyic<br>vnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvs<br>hedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapie<br>ktiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsd<br>gsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1107) |
| TNT-424 | EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKG<br>LEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE<br>DTAVYYCARATLQLWLPLFDYWGQGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsg<br>gtaalglvkdylpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglylssvvtvpssslgtqtyicvnhkps<br>ntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevk  |



|         |  |
|---------|--|
|         | fnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakg<br>qprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflysk<br>ltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1108)   |
| TNT-425 | QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYYWIWIRQPAGKGLE<br>WIGRIYTTGGAKYNPSLKS RVTMSIDTSKNNFSLKLSSVTAADTA V<br>YFCARDRNWEWNFDLWGRGTLTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalglv<br>kdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslsvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br>epkscdkthtcppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br>vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepq<br>ytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrw<br>qqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1109)   |
| TNT-426 | QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSMSSYFWSWIRQPPERGLE<br>WVGYMYYSGNTNYPNPSLKS RVTTSIDTSKNQFSLKLTSVTAADTA<br>VYYCARSNGFYWNFDLWGRGTLTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalglv<br>vkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslsvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br>vepkscdkthtcppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvd<br>gvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprep<br>vytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksr<br>wqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1110) |
| TNT-427 | QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTISGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEW<br>IGYIFYIGNTYYPNPSLKS RVTISVDASKNQFSLKLSSVTAADTA VYY<br>CARSYPYWYFDLWGRGTLTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalglvkdyp<br>epvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslsvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepksc<br>dkthtcppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhn<br>aktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlpps<br>reemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrwqqgn<br>vfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1111)   |
| TNT-414 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTGYMHVVRQAPGQ<br>GLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRS<br>DDTA VYYCARGSALHFFGVFDYWGGTLTVSSastkgpsvfplapsskst<br>sggtaalglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslsvvtvpssslgtqtyicnvnhk<br>psntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpe<br>vkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiska<br>kgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsffly<br>skltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1112) |

|         |  |
|---------|--|
| TNT-428 | <p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL<br/> EWMGGIIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED<br/> AVYYCAAGYYYDSSGYYHQPYYFDYWGQGTLVTVSSastkgpsvfpla<br/> psskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyic<br/> nvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvs<br/> hedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapie<br/> ktiskakgqprepqvylppreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsd<br/> gsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1113)</p> |
| TNT-429 | <p>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYYWIWIRQPAGKGLE<br/> WIGRIYTTGGAKYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV<br/> YFCARDRNWEWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclv<br/> kdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br/> epkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br/> vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv<br/> ylppreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrw<br/> qqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1114)</p>        |
| TNT-430 | <p>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISDYYWSWIRQPAGKGLE<br/> WIGRIYTTGGAKYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV<br/> YYCARDRNWEWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclv<br/> kdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br/> epkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br/> vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv<br/> ylppreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrw<br/> qqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1115)</p>        |
| TNT-431 | <p>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSMSSYFWSWIRQPPGKGLE<br/> WIGYMYYSNTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV<br/> YYCARSGNFYWNFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclv<br/> kdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkk<br/> epkscdkthtppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg<br/> vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv<br/> ylppreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrw<br/> qqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1116)</p>         |
| TNT-432 | <p>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLE<br/> WIGYIFYIGNTYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY<br/> YCARSYPYWFYFDLWGRGTLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyf</p>  |

|  |  |
|--|--|
|  | <p>pepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepks<br/> cdkthtcppcpapellAgpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevh<br/> naktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylpp<br/> sreemtknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgn<br/> vfscsvmhealthnhytqkslslspg (SEQ ID NO:1117)</p> |
|--|--|

[0365] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:236, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:224. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:236, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1070.

[0366] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:237, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:225. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:237, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1071.

[0367] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:238, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:226. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:238, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1072.

[0368] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:239, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:227. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:239, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1073.

[0369] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:240, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:228. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:240, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1074.

[0370] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:241, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:229. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:241, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1075.

[0371] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:242, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:230. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:242, и тяжелую цепь, включающую SEQ













включающую SEQ ID NO:1116.

[0412] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1012, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1065. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1022, и тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1117.

[0413] Антитела, нацеленные на антигены клеточной поверхности, могут запускать иммуностимулирующие и эффекторные функции, связанные с взаимодействием с Fc-рецептором (FcR) на иммунных клетках. Существует ряд Fc-рецепторов, которые являются специфическими для определенных классов антител, включая IgG (гамма-рецепторы), IgE (эта-рецепторы), IgA (альфа-рецепторы) и IgM (мю-рецепторы). Связывание Fc-области с Fc-рецепторами на поверхности клеток может запускать ряд биологических ответов, включая фагоцитоз покрытых антителами частиц (антитело-зависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз, или ADCP), клиренс иммунных комплексов, лизис покрытых антителами клеток посредством киллерных клеток (антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, или ADCC) и высвобождение медиаторов воспаления, плацентарный перенос и контроль продукции иммуноглобулинов. Кроме того, связывание C1 компонента комплемента с антителами может активировать систему комплемента и комплемент-зависимый цитолиз (CDC). Активация комплемента может иметь важное значение для лизиса клеточных патогенов. Однако активация комплемента может также стимулировать воспалительный ответ, а также может быть вовлечена в аутоиммунную гиперчувствительность или другие иммунологические расстройства. Вариантные Fc-области со сниженной или устраненной способностью связывать определенные Fc-рецепторы полезны для разработки терапевтических антител и Fc-слитых полипептидных конструкций, которые действуют путем нацеливания, активации или нейтрализации лигандных функций, не повреждая и не разрушая при этом местные клетки или ткани. Вариантные Fc-области с усиленными или активными Fc-доменами, которые связываются с определенными Fc-рецепторами, также полезны для разработки терапевтических антител и Fc-слитых полипептидных конструкций и могут обеспечивать активный или усиленный иммунный ответ. Fc-домен не вовлечен непосредственно в связывание антитела с его мишенью, но может быть вовлечен в различные эффекторные функции, такие как участие антитела в ADCP, ADCC и CDC. В некоторых вариантах осуществления, которые можно комбинировать с любым из вышеизложенных вариантов осуществления, антитело к нектину-4 или конъюгат антитела к нектину-4 включает Fc-область. В некоторых вариантах осуществления антител к нектину-4 и конъюгатов антител к нектину-4, описанных в настоящей заявке, Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1. В некоторых случаях Fc-домен человеческого IgG1 представляет собой Fc-домен IgG1 дикого типа, такой как Fc-домен человеческого IgG1 дикого типа. В некоторых случаях Fc-домен человеческого IgG1 представляет собой вариант Fc человеческого IgG1, такой как вариант Fc IgG1

человека. В некоторых случаях вариант Fc IgG1 человека имеет в общей сложности до 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 или меньше мутаций по сравнению с последовательностью человеческого IgG1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления в такой вариант Fc IgG1 включена одна или несколько дополнительных делеций. Например, в некоторых вариантах осуществления С-концевой лизин константной области тяжелой цепи Fc IgG1 удален, например, для повышения гомогенности полипептида, когда полипептид продуцируется в бактериальных клетках или клетках млекопитающих.

[0414] В некоторых вариантах осуществления антител к нектину-4 и конъюгатов антител к нектину-4, описанных в настоящей заявке, Fc-область представляет собой вариантную Fc-область (также называемую в настоящей заявке как ненативные Fc-области и вариантные Fc-домены) с пониженной или устраненной способностью связываться с определенными Fc-рецепторами. Такие варианты Fc полезны для разработки терапевтических антител и терапевтических конъюгатов, которые действуют путем таргетирования, активации или нейтрализации лигандных функций, не повреждая и не разрушая при этом местные клетки или ткани. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен в антителе или конъюгате по изобретению включает одну или несколько аминокислотных замен, добавлений или вставок, делеций, или любые их комбинации, которые приводят к пониженной эффекторной функции, такой как пониженная антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), пониженный комплемент-зависимый цитолиз (CDC), пониженный антитело-зависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP) или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты по изобретению характеризуются пониженным связыванием (например, минимальным связыванием или отсутствием связывания) с человеческим Fc-рецептором и пониженным связыванием (например, минимальным связыванием или отсутствием связывания) с белком C1q комплемента. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты включают Fc-область с пониженной эффекторной функцией, и Fc-область включает одну или несколько из мутаций, показанных в Таблице 25 ниже.

Таблица 25

#### Модификации Fc, которые привели к снижению эффекторной функции

| Мутация             | Фенотип  | Пониженная эффекторная функция |
|---------------------|--|--------------------------------|
| Leu235Glu           | Пониженное связывание с FcγR клеточной поверхности | ADCC                           |
| Leu234Ala/Leu235Ala | Пониженное связывание с FcγRI, II, III             | ADCC, ADCP, CDC                |
| Ser228Pro/Leu235Glu | Пониженное связывание с FcγRI                      | ADCC                           |

|   |  |                    |
|---|--|--------------------|
| Leu234Ala/Leu235Ala/Pro329Gly   | Устраненное связывание с FcγRI, II, III, C1q   | ADCP               |
| Leu234Glu/Leu235Phe/Pro331Ser   | Пониженное связывание с FcγRI, II, III и C1q   | CDC                |
| Asp265Ala   | Пониженное связывание с FcγRI, II, III   | ADCC<br>ADCP       |
| Gly237Ala   | Пониженное связывание с FcγRII   | ADCP               |
| Glu318Ala   | Пониженное связывание с FcγRII   | ADCP               |
| Glu233Pro   | Пониженное связывание с FcγRI, II и III  | ADCC<br>ADCP       |
| Gly236Arg/Leu328Arg   | Пониженное связывание со всеми FcγR  | ADCC               |
| His268Gln/Val309Leu/Ala330Ser/Pro331Ser                                   | Пониженное связывание со всеми FcγR<br>Пониженное связывание с C1q   | ADCC, ADCP,<br>CDC |
| Val234Ala/Gly237Ala/Pro238Ser/<br>His268Ala/Val309Leu/Ala330Ser/Pro331Ser | Почти полное устранение связывания FcγRI, IIa, IIb, и IIIa<br>Пониженное связывание с C1q<br>Связывается с FcγRn | ADCC, ADCP,<br>CDC |
| Leu234Ala/L235Ala/Gly237Ala/P238Ser/<br>His268Ala/Ala330Ser/Pro331Ser     | Почти полное устранение связывания с FcγRI, IIa, IIb, и IIIa<br>Связывается с FcγRn                              | ADCC, CDC          |
| Leu235Ala/Gly237Ala/Glu318Ala   | Неспособный к связыванию с человеческими клеточными линиями, экспрессирующими FcγR                               | ADCC               |
| Ala330Leu   | Пониженное связывание с C1q  | CDC                |
| Asp270Ala   | Пониженное связывание с C1q  | CDC                |
| Lys322Ala   | Пониженное связывание с C1q  | CDC                |
| Pro329Ala   | Пониженное связывание с C1q  | CDC                |
| Pro331Ala   | Пониженное связывание с C1q  | CDC                |
| Val264Ala   | Пониженное связывание с C1q  | CDC                |
| Phe241Ala   | Пониженное связывание с C1q  | CDC                |
| Asn297Ala или Gly или Gln   | Пониженное связывание с FcγRI и IIIa   | ADCC, ADCP,        |

|   |   |           |
|---|---|-----------|
|   | Пониженное связывание с C1q   | CDC       |
| Ser228Pro/Phe234Ala/Leu235Ala                     | Пониженное связывание с FcγRI, IIa и IIIa   | ADCC, CDC |
| Ser298Gly/ Thr299Ala                              | Устраненное или существенно пониженное связывание с C1q и большинством FcγR                         | ADCC, CDC |
| Leu234Phe/ Leu235Glu/ Asp265Ala                   | Отсутствие определяемого связывания с FcγRI и пониженное связывание с C1q                           | ADCC, CDC |
| Ser267Glu/ Leu328Phe                              | Повышение аффинности связывания с FcγRIIB;<br>устраненное связывание с FcγRIIIA-V158                | ADCC      |
| Pro238Asp   | Повышение аффинности связывания с FcγRIIB; Снижение связывания с FcγRI, FcγRIIA-H131, FcγRIIIA-V131 | ADCP      |
| Glu237Asp/Pro238Asp/His268Asp/Pro271Gly/Ala330Arg | Повышение аффинности связывания с FcγRIIB   | ADCP      |
| Glu233Asp/ Pro238Asp/ Pro271Gly/Ala330Arg         | Повышение аффинности связывания с FcγRIIB;<br>Снижение связывания с FcγRI и FcγRIIA-H131            | ADCP      |
| Asn298Ala   | Отсутствие связывания Fc-рецептора и комплемента  | ADCC, CDC |

[0415] В некоторых вариантах осуществления Fc-домен может относиться к димеру из двух мономеров Fc-домена. В Fc-доме дикого типа два мономера Fc-домена димеризуются за счет взаимодействия между двумя константными доменами CH3 антитела, а также одной или более дисульфидных связей, которые образуются между шарнирными доменами двух димеризованных мономеров Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен мутирован для устранения эффекторных функций, например, «мертвый Fc-домен». В некоторых вариантах осуществления каждый из мономеров Fc-домена в Fc-доме включает аминокислотные замены в константном домене CH2 антитела для уменьшения взаимодействия или связывания между Fc-доме и Fc-рецептором, таким как рецептор Fcγ (FcγR), рецептор Fcα (FcαR) или Fcε (FcεR).

[0416] Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, которая

также указана в настоящей заявке как ADCC, относится к форме цитотоксичности, при которой секретированный Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на некоторых цитотоксических клетках (например, естественных киллерных (NK) клетках и нейтрофилах), способен обеспечивать связывание этих цитотоксических эффекторных клеток с несущей антиген клеткой-мишенью и последующего уничтожения клетки-мишени. Антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз, который также указан в настоящей заявке как ADCP, относится к форме цитотоксичности, при которой секретированный Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на некоторых фагоцитирующих клетках (например, макрофагах), способен обеспечивать специфическое связывание этих фагоцитирующих эффекторных клеток с несущей антиген клеткой-мишенью и последующего захвата и переваривания клетки-мишени. Лиганд-специфичные высокоаффинные IgG антитела, направленные на поверхность клеток-мишеней, могут стимулировать цитотоксические или фагоцитирующие клетки и могут использоваться для такого уничтожения. Fc-рецепторы включают, но не ограничиваются этим, FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRIIc (CD32c), FcγRIIIa (CD16a) и FcγRIIIb (CD16b).

[0417] В некоторых вариантах осуществления варианты Fc IgG в настоящем изобретении минимально гликозилированы или имеют уменьшенное гликозилирование по сравнению с последовательностью дикого типа. В некоторых вариантах осуществления уменьшенное гликозилирование модулирует уровень эффекторной функции, обеспечиваемой Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование осуществляется путем мутации N297A или путем мутации N297 в любую аминокислоту, отличную от N. В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование осуществляется путем разрушения мотива N-Хаа1-Хаа2-Хаа3 (где N=аспарагин; Хаа1=любая аминокислота, кроме P (пролина); Хаа2=T (треонин), S (серин) или C (цистеин); и Хаа3=любая аминокислота, кроме P (пролина)). В одном варианте осуществления мотив N-Хаа1-Хаа2-Хаа3 относится к остаткам 297-300, обозначенным в соответствии с Kabat et al., 1991. В некоторых вариантах осуществления мутация любого одного или нескольких из N, Хаа1, Хаа2 или Хаа3 приводит к дегликозилированию варианта Fc.

[0418] В некоторых вариантах осуществления представленные антитела или конъюгаты, включающие вариантную Fc-область, демонстрируют пониженное или отсутствие связывания с по меньшей мере одним из Fcγ рецепторов CD16a, CD32a, CD32b, CD32c и CD64 по сравнению с полипептидной конструкцией, включающей нативную Fc-область. В некоторых случаях антитела или конъюгаты, описанные в настоящей заявке, демонстрируют пониженное или отсутствие связывания с Fcγ рецепторами CD16a, CD32a, CD32b, CD32c и CD64. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc демонстрирует пониженное связывание с вышеуказанным Fc-рецептором по сравнению с Fc-областью человеческого IgG дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc демонстрирует отсутствие связывания с вышеуказанным Fc-рецептором по сравнению с Fc-областью человеческого IgG дикого

типа. В некоторых случаях вариант Fc имеет связывание с Fc $\gamma$  рецептором, уменьшенное на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (полностью устраненная эффекторная функция). В некоторых вариантах осуществления пониженное связывание проявляется в отношении любого одного или нескольких Fc $\gamma$  рецепторов, например CD16a, CD32a, CD32b, CD32c или CD64. В некоторых вариантах осуществления уменьшение или устранение связывания с Fc $\gamma$  рецептором приводит к уменьшению или устранению ADCC. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты, включающие вариант Fc, описанный в настоящей заявке, демонстрируют снижение ADCC по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты, включающие вариант Fc, описанный в настоящей заявке, демонстрируют 100% устранение (полное устранение) ADCC.

[0419] В некоторых вариантах осуществления вариант Fc демонстрирует снижение фагоцитоза (ADCP) по сравнению с Fc-областью человеческого IgG дикого типа. Такие варианты Fc демонстрируют снижение фагоцитоза по сравнению с Fc-областью человеческого IgG дикого типа, где активность фагоцитоза снижается, например, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых случаях вариант Fc демонстрирует устранение фагоцитоза по сравнению с Fc-областью человеческого IgG дикого типа.

[0420] Комплемент-направленная цитотоксичность, которая также указана в настоящей заявке как CDC, относится к форме цитотоксичности, при которой каскад комплемента активируется посредством связывания компонента C1q комплемента с Fc антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела и конъюгаты, включающие ненативную Fc-область, как описано в настоящей заявке, демонстрируют снижение связывания C1q по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше по сравнению с антителом или конъюгатом, включающим Fc-область дикого типа. В некоторых случаях, антитела или конъюгаты, включающие ненативную Fc-область, описанную в настоящей заявке, демонстрируют пониженную CDC по сравнению с антителами или конъюгатами, включающими Fc-область дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитела и конъюгаты, включающие ненативную Fc-область, описанную в настоящей заявке, демонстрируют снижение CDC по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше по сравнению с антителами или конъюгатами, включающими Fc-область дикого типа. В некоторых случаях антитела или конъюгаты, включающие ненативный вариант Fc, описанный в настоящей заявке, демонстрируют незначительную CDC по сравнению с антителами или конъюгатами, включающими Fc-область дикого типа.

[0421] В некоторых случаях антитела или конъюгаты, включающие ненативный вариант Fc, описанный в настоящей заявке, демонстрируют пониженную или незначительную CDC, а также характеризуются пониженным связыванием (например, минимальным связыванием или отсутствием связывания) с одним или несколькими из

человеческих FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRIIc (CD32c), FcγRIIIa (CD16a) и FcγRIIIb (CD16b). В некоторых вариантах осуществления Fc-область антител или конъюгатов, описанных в настоящей заявке, обладает дикого типа или нативной активностью CDC. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антител или конъюгатов, описанных в настоящей заявке, обладает дикого типа или нативной активностью CDC и характеризуется пониженным связыванием (например, минимальным связыванием или отсутствием связывания) с одним или несколькими их человеческих FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRIIc (CD32c), FcγRIIIa (CD16a) и FcγRIIIb (CD16b).

[0422] В некоторых вариантах осуществления антитела к нектину-4 или конъюгаты антител к нектину-4, описанные в настоящей заявке, включают Fc-область IgG, выбранную из группы, состоящей из Fc-области IgG1, Fc-области IgG2 и Fc-области IgG4. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1, IgG2 или IgG4 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG представляет собой Fc-область человеческого IgG, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают или устраняют одну или несколько эффекторных функций по сравнению с эффекторной функцией(яункциями) человеческой Fc-области, которая не содержит аминокислотную замену(замены). Например, в некоторых вариантах осуществления Fc-домен IgG мутирован таким образом, чтобы он не обладал эффекторными функциями, типично для “мертвого” Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления для изменения или снижения антитело-зависимой эффекторной функции, такой как ADCC, CDC, ADCP или любая их комбинация, Fc-домены в антителах или конъюгатах по изобретению относятся к классу IgG и включают одну или несколько аминокислотных замен в положении E233, L234, L235, G236, G237, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 или P329 (нумерация в соответствии с EU-индексом согласно Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)); нумерацию по Kabat аминокислотных остатков можно определить для данного антитела путем выравнивания по областям гомологии последовательности антитела со “стандартной” пронумерованной в соответствии с Kabat последовательностью).

[0423] В некоторых вариантах осуществления варианты Fc IgG в настоящем изобретении минимально гликозилированы или имеют уменьшенное гликозилирование по сравнению с последовательностью дикого типа. В некоторых вариантах осуществления уменьшенное гликозилирование модулирует уровень эффекторной функции, обеспечиваемой Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование осуществляется путем мутации N297A или путем мутации N297 в любую аминокислоту, отличную от N. В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование осуществляется путем разрушения мотива N-Хаа1-Хаа2-Хаа3 (где N=аспарагин; Хаа1=любая аминокислота, кроме P (пролина); Хаа2=Т (треонин), S (серин) или C (цистеин); и Хаа3=любая аминокислота, кроме P (пролина)). В одном варианте

осуществления мотив N-Хаа1-Хаа2-Хаа3 относится к остаткам 297-300, обозначенным в соответствии с Kabat et al., 1991. В некоторых вариантах осуществления мутация любого одного или нескольких из N, Хаа1, Хаа2 или Хаа3 приводит к дегликозилированию варианта Fc.

[0424] В некоторых вариантах осуществления антител к нектину-4 и конъюгатов антител к нектину-4, описанных в настоящей заявке, Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1. В некоторых случаях Fc-домен человеческого IgG1 представляет собой Fc-домен IgG1 дикого типа, такой как Fc-домен человеческого IgG1 дикого типа. В некоторых случаях Fc-домен человеческого IgG1 представляет собой вариант Fc IgG1 человека, такой как Fc-вариант IgG1 человека. В некоторых случаях Fc-вариант IgG1 человека содержит в общей сложности до 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 или менее мутаций по сравнению с последовательностью человеческого IgG1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления в такой Fc-вариант IgG1 включена одна или несколько дополнительных делеций. Например, в некоторых вариантах осуществления C-концевой лизин константной области тяжелой цепи Fc IgG1 делетирован, например для повышения гомогенности полипептида, когда полипептид продуцируется в бактериальных клетках или клетках млекопитающего.

[0425] В некоторых вариантах осуществления мономер Fc-домена происходит из антитела IgG1 и включает одну или несколько из аминокислотных замен L234A, L235A, G237A и N297A (обозначение в соответствии с EU-системой нумерации, согласно Kabat et al., 1991). В некоторых вариантах осуществления в такой Fc-вариант IgG1 включена одна или несколько дополнительных мутаций. Неограничивающие примеры таких дополнительных мутаций для Fc-вариантов человеческого IgG1 включают E318A и K322A.

[0426] В некоторых вариантах осуществления Fc-домен включает специфические аминокислотные замены, которые известны как минимизирующие взаимодействие между Fc-доменом и Fc $\gamma$  рецептором. В некоторых случаях Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1, включающую замены L234A, L235A и/или G237A, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом. В некоторых вариантах осуществления Fc-вариант включает по меньшей мере одну из мутаций L234A, L235A, G237A. В некоторых вариантах осуществления Fc-вариант включает по меньшей мере две из мутаций L234A, L235A, G237A Fc-области IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-вариант включает мутации L234A, L235A, и G237A Fc-области IgG1 (IgG1 AAA). В некоторых вариантах осуществления Fc-вариант IgG1 включает 1, 2 или 3 из мутаций L234A, L235A и G237A, а также включает одну или более дополнительных мутаций, таких как N297A и D265A.

[0427] В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты включают вариантную Fc-область с одной или более модификациями, которые повышают период полужизни антитела, например посредством ассоциации антитела с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), приводящей к рециркуляции антитела и минимальной эндосомальной



деградации. В некоторых случаях Fc-варианты с увеличенным периодом полужизни могут иметь повышенное или усиленное связывание или аффинность в отношении одного или нескольких Fc-рецепторов. В некоторых случаях на связывание или аффинность может влиять определенный диапазон pH, например pH в эндосоме. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты по настоящему изобретению включают вариантную Fc-область с одной или более модификациями, которые улучшают период полужизни антитела в кровотоке, и включают одну или несколько мутаций, представленных в Таблице 26 ниже.

Таблица 26

**Модификации Fc для увеличения периода полужизни антитела в кровотоке**

| Мутация   | Фенотип   |
|---|---|
| Arg435His   | Повышенное связывание с FcRn при низком pH  |
| Asn434Ala   | Повышенное связывание с FcRn при низком pH  |
| Met252Tyr/Ser254Thr/Thr256Glu                       | Замедленная скорость диссоциации для Fc и FcRn<br>Повышенная аффинность к FcRn<br>Пониженная ADCC                                       |
| Met252Tyr/Ser254Thr/Thr256Glu+His433K/<br>Asn434Phe | Повышение связывания с FcRn как при эндосомальном pH, так и при внеклеточном pH   |
| Met428Leu/Asn434Ser                                 | Повышенная аффинность к FcRn и замедленная скорость диссоциации для FcRn при pH<br>ADCC без изменений                                   |
| Thr252Leu/Thr253Ser/Thr254Phe                       | Повышенное связывание с FcRn при низком pH  |
| Glu294delta/Thr307Pro/Asn434Tyr                     | Повышенное связывание с FcRn при низком pH<br>Отсутствие связывания с FcRn при внеклеточном pH<br>Пониженное связывание FcγRIIIa и ADCC |
| Thr256Asn/Ala378Val/ Ser383Asn/Asn434Tyr            | Повышенное связывание с FcRn при  |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
|                                 | низком pH<br>Отсутствие связывания с FcRn при<br>внеклеточном pH   |
| Glu294delta                     | Повышенное сиалилирование  |
| Thr252Leu/ Thr254Ser/ Thr256Phe | Увеличение биологического периода<br>полужизни   |
| Met252Tyr/ Val308Pro/ Asn343Tyr | Усиленное связывание с FcRn при<br>внеклеточном pH и внеклеточном pH   |
| Leu309Asp/ Gln311His/ Asn434Ser | Усиление связывания с FcRn при<br>эндосомальном pH и отсутствие<br>связывания с FcRn при внеклеточном pH   |
| His285Asp/ Thr307Gln/ Ala378Val | Усиленное связывание с FcRn при<br>эндосомальном pH  |
| His433Lys/ Asn434Phe            | Усиленное связывание с FcRn при<br>эндосомальном pH с минимальным<br>изменением связывания с FcRn при<br>внеклеточном pH   |
| Val308Pro                       | Усиление связывания с FcRn при<br>эндосомальном pH, но без изменений<br>связывания с FcRn при внеклеточном pH<br>7   |
| Thr250Gln/Met428Leu             | Повышение связывания с FcRn при<br>эндосомальном pH, не влияя при этом на<br>связывание с FcRn при внеклеточном pH   |
| Thr307Ala/Glu380Ala/Asn434Ala   | Повышение связывания с FcRn при<br>эндосомальном pH, при этом сохраняя<br>эквивалентное связывание с<br>низкоаффинными FcγR; повышенное<br>связывание с FcRn при внеклеточном pH |

[0428] В некоторых вариантах осуществления антител к нектину-4 и конъюгатов антител к нектину-4, описанных в настоящей заявке, Fc-область представляет собой вариантную Fc-область с усиленной эффекторной функцией, такой как усиленное связывание или активность в отношении одного или нескольких Fc-рецепторов. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антител или конъюгатов, описанных в настоящей заявке характеризуется усиленным или повышенным связыванием с одним или

несколькими из человеческих FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRIIc (CD32c), FcγRIIIa (CD16a) и FcγRIIIb. В некоторых случаях вариантная Fc-область обладает улучшенным связыванием с C1q. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антител или конъюгатов, описанных в настоящей заявке, характеризуется усиленным или повышенным связыванием с одним или несколькими из человеческих FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRIIc (CD32c), FcγRIIIa (CD16a) и FcγRIIIb, и Fc-область обладает улучшенным связыванием с C1q. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты включают Fc-область с усиленной эффекторной функцией, и Fc-область включает одну или несколько из мутаций, показанных в Таблице 27 ниже.

[0429] В некоторых вариантах осуществления Fc-область сконструирована так, чтобы улучшить эффекторную функцию, включая, но не ограничиваясь этим, модификации Fc и усиленные эффекторные функции, описанные в Таблице 27 ниже. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты в настоящем изобретении включают вариантную Fc-область, проявляющую усиленную антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC активность). В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область демонстрирует повышение ADCC активности по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с Fc-областью дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты в настоящем изобретении включают вариантную Fc-область, демонстрирующую повышенный антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP активность). В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область демонстрирует повышение ADCP активности по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с Fc-областью дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты в настоящем изобретении включают вариантную Fc-область, демонстрирующую усиленную комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC активность). В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область демонстрирует повышение CDC активности по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с Fc-областью дикого типа.

Таблица 27

**Модификации Fc, которые усиливают эффекторную функцию**

| Мутация                           | Фенотип                             | Усиленная эффекторная функция |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| Ser298Ala/Glu333Ala/<br>Lys334Ala | Повышенная аффинность к<br>FcγRIIIa | ADCC                          |
| Ser239Asp/Ala330Leu/<br>Ile332Glu | Повышенная аффинность к<br>FcγRIIIa | ADCC, ADCP                    |

|   |   |            |
|---|---|------------|
|   | Низкое связывание с ингибиторным FcγRIIb  |            |
| Ser239Asp/Ile332Glu   | Повышенное связывание с FcγRIIIa<br>Сильное связывание с ингибиторным FcγRIIb                 | ADCC, ADCP |
| Gly236Ala/Ser239Asp/<br>Ala330Leu/Ile332Glu   | Повышенная аффинность связывания с FcγRIIIa и FcγRIIIa  | ADCC       |
| Gly236Ala   | Повышает аффинность к FcγRIIIa  | ADCP       |
| Gly236Ala/Ser239Asp/ Ile332Glu  | Повышает связывание с FcγRIIIa и FcγRIIIa<br>Усиленное связывание с FcγRIIb                   | ADCC, ADCP |
| Leu234Tyr/Gly236Trp/<br>Ser298Ala   | Повышенная аффинность к FcγRIIIa, когда присутствуют в 1 константной области тяжелой цепи     | ADCC       |
| Phe243Leu/Arg292Pro/ Tyr300Leu/<br>Val305Ile/<br>Pro396Leu  | Повышенные скорости диссоциации для FcγRIIIa и FcγRIIIa                                       | ADCC       |
| Ser267Glu/His268Phe/<br>Ser324Thr/Gly236Ala/ Ise332Glu  | Повышенное связывание с C1q   | ADCC, CDC  |
| Glu345 Lys  | Повышенное связывание с C1q   | ADCC, CDC  |
| Glu430Gly   | Повышенное связывание с C1q   | ADCC, CDC  |
| Leu235Val/Phe243Leu/<br>Arg292Pro/Tyr300Leu/ Pro396Leu  | Повышенное связывание с FcγRIIIa  | ADCC       |
| Glu236Ala/Ala330Leu/<br>Ile332Glu   | Повышенное связывание с FcγRIIIa и FcγRIIIa   | ADCC       |
| Одна тяжелая цепь:<br>Leu234Tyr/Leu235Gln/<br>Gly236Trp/Ser239Met/<br>His268Asp/Asp270Glu/ Ser298Ala<br>противоположная тяжелая цепь: | Повышенная аффинность связывания с FcγRIIIa-H131, FcγRIIIa-R131, FcγRIIIa-F158, FcγRIIIa-V158 | ADCC       |

|                                    |            |  |     |
|------------------------------------|------------|--|-----|
| Asp270Glu/<br>Ala330Met/ Lys334Glu | Lys326Asp/ |  |     |
| Lys326Trp/Glu333Ser                |            | Повышенное связывание с C1q<br>Улучшенная CDC активность | CDC |
| Lys326Ala/Glu333Ala                |            | Повышенное связывание с C1q                              | CDC |
| Lys326Met/Glu333Ser                |            | Повышенная CDC активность                                | CDC |
| Cys221Asp/Asp222Cys                |            | Повышенное связывание C1q                                | CDC |
| Ser267Glu, His268Phe, и Ser324Thr  |            | Повышенное связывание с C1q                              | CDC |
| Ser267Glu/ His268Glu/ Ser324Thr    |            | Повышенная аффинность<br>связывания с C1q                | CDC |
| His268Phe и Ser324Thr              |            | Улучшенная CDC   | CDC |
| Glu345Arg                          |            | Повышенное связывание с C1q                              | CDC |
| Glu345Arg/ Glu430Gly/ Ser440Tyr    |            | Улучшенная CDC   | CDC |

[0430] В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты в настоящем изобретении, включающие вариантную Fc-область, демонстрируют улучшенное связывание с по меньшей мере одним из Fcγ рецепторов CD16a, CD32a, CD32b, CD32c и CD64 по сравнению с полипептидной конструкцией, включающей нативную Fc-область. В некоторых случаях антитела или конъюгаты, описанные в настоящей заявке, демонстрируют улучшенное связывание с Fcγ рецепторами CD16a, CD32a, CD32b, CD32c и CD64. В некоторых вариантах осуществления Fc-вариант демонстрирует улучшенное связывание с рассматриваемым Fc-рецептором по сравнению с Fc-областью человеческого IgG дикого типа. В некоторых случаях Fc-вариант обладает улучшенным связыванием с Fcγ рецептором, которое выше на 10%, 20% 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более по сравнению с диким типом. В некоторых вариантах осуществления улучшенное связывание проявляется в отношении любого одного или более Fcγ рецепторов, например, CD16a, CD32a, CD32b, CD32c или CD64. В некоторых вариантах осуществления улучшенное связывание с Fcγ рецептором приводит к улучшению ADCC. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты, включающие вариантную Fc, описанную в настоящей заявке, демонстрируют улучшение ADCC по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более.

[0431] В некоторых вариантах осуществления Fc-вариант демонстрирует улучшение фагоцитоза (ADCP) по сравнению с Fc-областью человеческого IgG дикого типа. Такие Fc-варианты демонстрируют улучшение фагоцитоза по сравнению с Fc-областью человеческого IgG дикого типа, при этом фагоцитоз улучшается например, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более.

[0432] Комплемент-направленная цитотоксичность, которая также указана в настоящей заявке как CDC, относится к форме цитотоксичности, при которой каскад

комплемента активируется посредством связывания компонента C1q комплемента с Fc антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела и конъюгаты, включающие ненативную Fc-область, как описано в настоящей заявке, демонстрируют улучшение связывания с C1q по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более по сравнению с антителом или конъюгатом, включающим Fc-область дикого типа. В некоторых случаях антитела или конъюгаты, включающие ненативную Fc-область, как описано в настоящей заявке, демонстрируют улучшенную CDC по сравнению с антителами или конъюгатами, включающими Fc-область дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты, включающие ненативную Fc-область, как описано в настоящей заявке, демонстрируют улучшение CDC по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более по сравнению с антителами или конъюгатами, включающими Fc-область дикого типа.

[0433] В некоторых случаях антитела или конъюгаты, включающие ненативный вариант Fc, описанный в настоящей заявке, демонстрируют улучшенную CDC и также характеризуются улучшенным связыванием (= с одним или несколькими из человеческих Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIa (CD32a), Fc $\gamma$ RIIb (CD32b), Fc $\gamma$ RIIc (CD32c), Fc $\gamma$ RIIIa (CD16a) и Fc $\gamma$ RIIIb (CD16b)). В некоторых вариантах осуществления Fc-область антител или конъюгатов, описанных в настоящей заявке, имеет CDC активность дикого типа или нативную. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антител или конъюгатов, описанных в настоящей заявке, имеет CDC активность дикого типа или нативную и характеризуется улучшенным связыванием с одним или несколькими из человеческих Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIa (CD32a), Fc $\gamma$ RIIb (CD32b), Fc $\gamma$ RIIc (CD32c), Fc $\gamma\gamma$ RIIIa (CD16a) и Fc $\gamma$ RIIIb (CD16b).

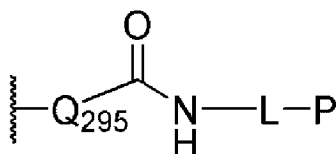
[0434] В любом из вариантов осуществления антитело к нектину-4 и конъюгаты антител к нектину-4 могут быть сконструированы для улучшения антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC активности), антитело-зависимого клеточно-опосредованного фагоцитоза (ADCP активности) и комплемент-зависимого цитолиза (CDC активности). В любом из вариантов осуществления антитело и конъюгаты могут включать две тяжелые цепи, и при этом по меньшей мере одна из двух или обе тяжелые цепи антитела являются нефукозилированными. В других вариантах осуществления антитело и конъюгат могут быть получены в клеточной линии с нокаутом альфа1,6-фукозилтрансферазы (Fut8). В некоторых других вариантах осуществления антитело и конъюгаты могут быть получены в клеточной линии, сверхэкспрессирующей  $\beta$ 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT-III). В других вариантах осуществления клеточная линия дополнительно сверхэкспрессирует  $\mu$ -маннозидазу Гольджи II (ManII). В любом из вариантов осуществления антитело и конъюгаты могут включать по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает ADCC активность.

[0435] В любом из вариантов осуществления антитело к нектину-4 и конъюгаты антител к нектину-4 могут включать по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-

области, которая улучшает ADCC активность. Некоторые иллюстративные модификации Fc включают следующие комбинации аминокислотных замен в Fc-области человеческих IgG, например, L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L, S239D/I332E, S239D/A330L/I332E, P247I/A339Q, S298A/E333A/K334A (Liu et al., *Fc-engineering for modulated effector functions - improving antibodies for cancer treatment*, *Antibodies* 2020, 9, 64; Kellner et al., *Modulating cytotoxic effector functions by Fc engineering to improve cancer therapy*, *Transfus. Med. Hemother.* 2017; 44: 327-336).

[0436] В некоторых вариантах осуществления Q-tag по настоящему изобретению присоединен к антителу против нектин-4. В некоторых вариантах осуществления Q-tag по настоящему изобретению присоединен к антителу против нектин-4 и Q-tag служит в качестве компонента для конъюгации олигонуклеотида, такого как CpG олигонуклеотид, который может быть конъюгирован с Q-tag при помощи линкера.

[0437] В некоторых вариантах осуществления Q-tag присоединен к тяжелой цепи антитела к нектину-4. В некоторых вариантах осуществления Q-tag присоединен к тяжелой цепи антитела к нектину-4 через линкер (*например*, аминокислотный или другой химический линкер). В некоторых вариантах осуществления Q-tag присоединен к тяжелой цепи антитела к нектину-4 (*например*, слит в рамке считывания с тяжелой цепью). В некоторых вариантах осуществления Q-tag присоединен на С-конце тяжелой цепи антитела к нектину-4. В некоторых вариантах осуществления Q-tag слит с С-концом тяжелой цепи антитела к нектину-4 (*например*, в рамке считывания и граничит с аминокислотной последовательностью С-конца). В некоторых вариантах осуществления Q-tag находится в Fc-домене антитела к нектину-4. В некоторых вариантах осуществления Q-tag имеет природное происхождение. Например, мутация N297, приводящая к N297A, делает доступным Q295 антитела, где может происходить конъюгация. В некоторых вариантах осуществления, где Fc-область включает замену N297A, конъюгат также включает иммуномодулирующий олигонуклеотид P, присоединенный к остатку Q295, как



показано в следующей формуле , где L представляет собой линкерную группу, связанную с Q295 через амидную связь.

[0438] В некоторых вариантах осуществления Q-tag включает одну или несколько последовательностей, показанных в Таблице 16.

**Таблица 16**

**Последовательности Q-tag пептида**

| SEQ ID NO. | Пептидные последовательности  |
|------------|---|
| <b>39</b>  | L <sub>S</sub> L <sub>S</sub> P <sub>G</sub> L <sub>L</sub> Q <sub>G</sub> G-OH |

|           |              |
|-----------|--------------|
| <b>40</b> | WPAQGPT      |
| <b>41</b> | WPQGPT       |
| <b>42</b> | WAPQGPT      |
| <b>43</b> | WAQGPT       |
| <b>44</b> | TPGQAPW      |
| <b>45</b> | PNPQLPF      |
| <b>46</b> | RPQQF        |
| <b>47</b> | RPQGF        |
| <b>48</b> | RPQGFPP      |
| <b>49</b> | RPQGFPP      |
| <b>50</b> | RPRPQQF      |
| <b>51</b> | LSQSKVLG     |
| <b>52</b> | WGGQLL       |
| <b>53</b> | WALQRPHYSYPD |
| <b>54</b> | WALQRPYTLTES |
| <b>55</b> | WALQGPYTLTES |

[0439] В некоторых вариантах осуществления антитело или конъюгат по настоящему изобретению может доставляться в виде конъюгата «голый белок-лекарственное средство» или в виде конъюгата «белок-лекарственное средство», представленного в композиции с носителем и доставляемого, например, в инкапсулированном виде или в виде части наночастицы, наночастицы, липосомы, полимерной везикулы или вирусной оболочки. В некоторых вариантах осуществления антитело или конъюгат по настоящему изобретению можно доставлять внутриклеточно, например, путем конъюгации с доменом трансдукции белка или миметиком. В некоторых вариантах осуществления антитело или конъюгат по настоящему изобретению можно доставлять посредством электропорации или микроинъекции.

[0440] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат обладает одной или несколькими эффекторными функциями, включая, без ограничения, ADCC и/или ADCP. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает человеческую Fc-область, например, Fc-область человеческого IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает Fc-область человеческого IgG1, IgG2 или IgG4 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат включает последовательность константного домена антитела SEQ ID NO:178.

[0441] В некоторых вариантах осуществления антитела к нектину-4 или конъюгаты антител к нектину-4, описанные в настоящей заявке, включают IgG Fc-область, выбранную из группы, состоящей из Fc-области IgG1, Fc-области IgG2 и Fc-области IgG4.



В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1, IgG2 или IgG4 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG представляет собой Fc-область человеческого IgG, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые повышают или усиливают одну или несколько эффекторных функций по сравнению с эффекторной функцией(функциями) человеческой Fc-области, которая не содержит аминокислотную замену(замены). Например, в некоторых вариантах осуществления Fc-домен IgG мутирован для повышения эффекторных функций, для создания “активного” или усиленного Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления для изменения или усиления антитело-зависимой эффекторной функции, такой как ADCC, CDC, ADCP или любая их комбинация, Fc-домены относятся к классу IgG и включают одну или несколько аминокислотных замен, описанных и перечисленных в Таблице 27.

[0442] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат по настоящему изобретению включает константный домен антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат по настоящему изобретению включает константный домен тяжелой цепи антитела и/или константный домен легкой цепи антитела, представленный в Таблице 17. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат по настоящему изобретению включает константный домен тяжелой цепи антитела, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO:92-107, 111, 112, 178 и 494-497. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 по настоящему изобретению включает константный домен тяжелой цепи антитела с Q-tag на C-конце Fc-области, например, как показано в SEQ ID No: 95 или 178. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат по настоящему изобретению включает две тяжелые цепи антитела, каждую с константным доменом, при этом каждая из двух тяжелых цепей антитела включает Q-tag на C-конце Fc-области, например, как показано в SEQ ID No: 95 или 178. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат по настоящему изобретению включает две тяжелые цепи антитела, каждую с константным доменом, при этом только одна из двух тяжелых цепей антитела включает Q-tag на C-конце Fc-области, например, как показано в SEQ ID No: 95 или 178. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат по настоящему изобретению включает константный домен легкой цепи антитела, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO:108-110. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат по настоящему изобретению включает нефукозилированный Fc-домен или Fc-домен с пониженным фукозилированием. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат по настоящему изобретению включает нефукозилированный Fc-домен или Fc-домен с пониженным фукозилированием, и константный домен антитела включает одну из SEQ ID NO:95, 112 и 178.

**Таблица 17**

**Последовательности константных доменов антител**

---

| Название         | SEQ ID NO: | Последовательность  |
|------------------|------------|---|
| IgG1 дикого типа | 92         | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE<br>MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG     |
| IgG1_AAA_N297A   | 93         | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br>REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT<br>PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQKSLSLSPG |
| IgG1_AAA         | 94         | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT<br>PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQKSLSLSPG |
| IgG1_AAA+Q-tag   | 95         | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT  |

|                  |    |   |
|------------------|----|---|
|                  |    | <p>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br/> THTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br/> VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br/> REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT<br/> PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGR<u>PQGF</u>GPP</p>  |
| IgG1_N297A       | 96 | <p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br/> PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br/> VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br/> THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br/> VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br/> REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE<br/> MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<br/> KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br/> QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p> |
| IgG1_D265A       | 97 | <p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br/> PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br/> VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br/> THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br/> VTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br/> REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE<br/> MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<br/> KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br/> QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p> |
| IgG1_N297A/D265A | 98 | <p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br/> PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br/> VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br/> THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br/> VTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br/> REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE</p>   |

|              |     |   |
|--------------|-----|---|
|              |     | <p>MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<br/> KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br/> QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>   |
| IgG2         | 99  | <p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP<br/> VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG<br/> LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDK<br/> TVERKCCVECPAPPVAGPSVFL<br/> FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNW<br/> YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV<br/> VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI<br/> SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ<br/> VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP<br/> MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br/> FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p> |
| IgG2Da       | 100 | <p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP<br/> VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br/> PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVE<br/> CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br/> VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ<br/> FNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br/> PSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS<br/> LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML<br/> DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br/> HNHYTQKSLSLSPG</p>     |
| IgG2Da_N297A | 101 | <p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP<br/> VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br/> PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVE<br/> CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br/> VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ<br/> FASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br/> PSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS<br/> LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML<br/> DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br/> HNHYTQKSLSLSPG</p>     |

|                  |     |  |
|------------------|-----|--|
| IgG2_N297A       | 102 | <p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP<br/> VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG<br/> LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDK<br/> TVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFL<br/> FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW<br/> YVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRV<br/> VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI<br/> SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ<br/> VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP<br/> MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br/> FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p> |
| IgG2Da_D265A     | 103 | <p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP<br/> VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVE<br/> CPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br/> VVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ<br/> FNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br/> PSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS<br/> LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML<br/> DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br/> HNHYTQKSLSLSPG</p>              |
| IgG4_S228P       | 104 | <p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP<br/> VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC<br/> PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br/> VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ<br/> FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br/> PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS<br/> LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD<br/> SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH<br/> NHYTQKSLSLSLG</p>            |
| IgG4_S228P_D265A | 105 | <p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP<br/> VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC<br/> PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</p>   |

|                   |     |  |
|-------------------|-----|--|
|                   |     | VVAVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ<br>FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br>PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS<br>LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD<br>SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSLG  |
| IgG4_S228P, L235E | 106 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>PSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC<br>PPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ<br>FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br>PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS<br>LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD<br>SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSLG  |
| IgG4_S228P, N297A | 107 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>PSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC<br>PPCPAPEFLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ<br>FASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br>PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS<br>LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD<br>SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSLG |
| IgG1_wt+Q-tag     | 178 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE<br>MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<br>KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW                            |

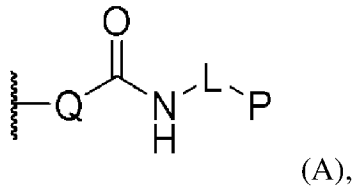
|                  |     |   |
|------------------|-----|---|
|                  |     | QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGRPQGF<br><u>GPP</u>  |
| IgG1             | 494 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELVGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br>PEEQYNSTLRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN<br>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP<br>VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPG            |
| IgG1 G236A       | 111 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT<br>PPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQKSLSLSPG         |
| IgG1 G236A+Q-tag | 112 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT<br>PPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQKSLSLSPGRPQGFQFP |
| IgG1_S239E/I332E | 495 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK   |

|                            |              |   |
|----------------------------|--------------|---|
|                            |              | THTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP<br>APEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT<br>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS<br>FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQK<br>SLSLSPG   |
| IgG1_S239D/A330L/I3<br>32E | 496          | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL<br>PLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL<br>TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD<br>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYT<br>QKSLSLSPG      |
| IgG1_P247I/A339Q           | 497          | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKIKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR<br>EEQYN<br>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKQKKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL<br>TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD<br>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNH<br>YTQKSLSLSPG |
| Каппа человека             | 108          | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPRE<br>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR<br>GEC   |
| Лямбда<br>человека         | IGLC1<br>109 | GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG<br>AVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYYAAS<br>SYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE   |



|                    |       |     |  |
|--------------------|-------|-----|--|
|                    |       |     | CS   |
| Лямбда<br>человека | IGLC2 | 110 | GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG<br>AVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS<br>YLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC<br>S |

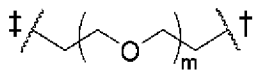
[0443] В другом аспекте настоящего изобретения обеспечивается конъюгат, включающий антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело к нектину-4 или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), включающими аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A),



где:

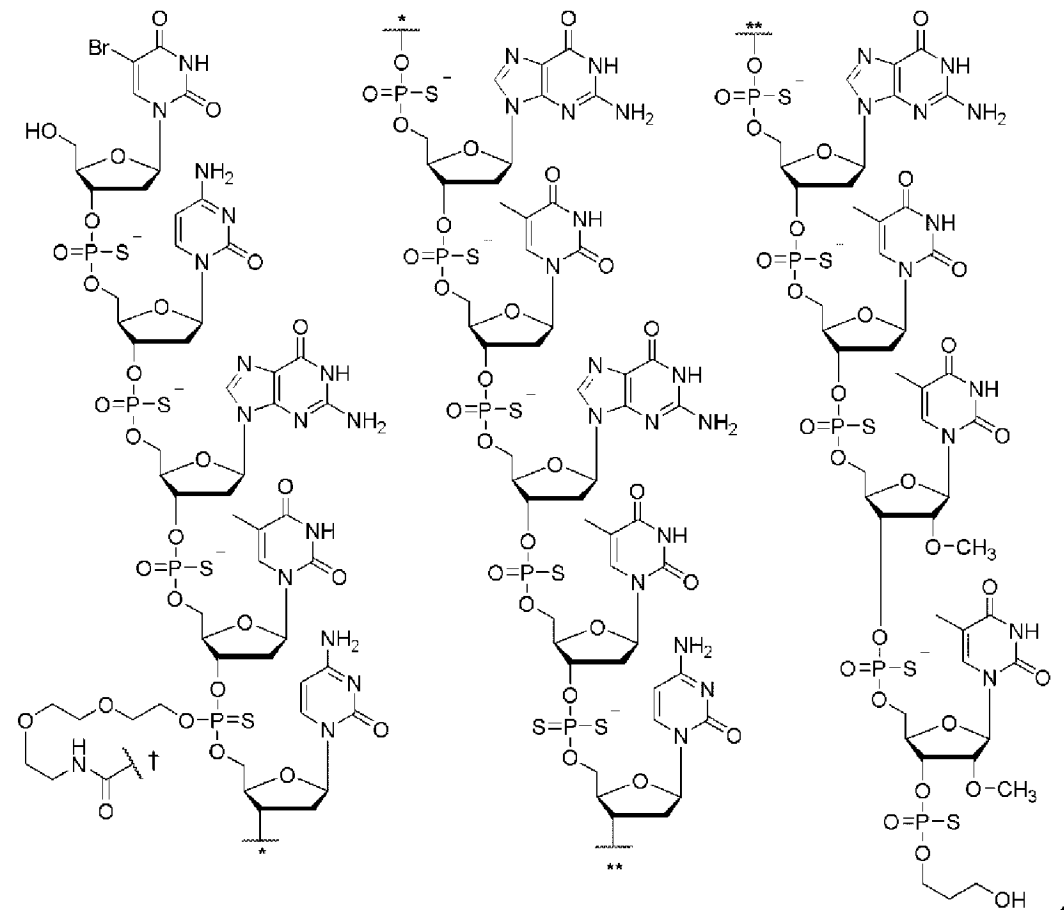
каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



где m представляет собой целое число, имеющее значение от около 0 до около 50 (например, от около 0 до около 10, от около 0 до около 30, от около 10 до около 30, от около 20 до около 30 и значения в промежутках между ними), и где  $\sim\sim\sim\dagger$  указывает точку присоединения к P, и  $\sim\sim\sim\dagger$  указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком;

и каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, включающий структуру



где  $\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где  $\sim^\dagger$  указывает точку присоединения к L;

где Ab включает переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где VH-домен включает последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH-домена, выбранной из группы последовательностей, раскрытых в Таблице 7, в соответствии с Kabat, Chothia или IMGT;

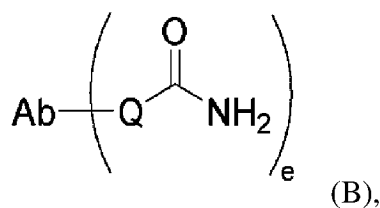
где VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности VL-домена, выбранной из группы последовательностей, раскрытых в Таблице 8, в соответствии с Kabat, Chothia или IMGT.

[0444] В других аспектах настоящим изобретением обеспечивается конъюгат, включающий белок, по меньшей мере одну пептидную последовательность Q-tag, включающую глутаминовый остаток, и по меньшей мере один иммуномодулирующий олигонуклеотид, где пептидная последовательность Q-tag является природной или синтетической, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag через амидную связь с глутаминовым остатком, где по меньшей мере одна пептидная последовательность Q-tag выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-55.

[0445] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий олигонуклеотид имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из олигонуклеотидов Таблицы 4 и Таблицы 6.

[0446] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 включает по меньшей мере одну пептидную последовательность Q-tag, включающую глутаминовый остаток. В некоторых вариантах осуществления пептидная последовательность Q-tag имеет природное происхождение или является синтетической. В некоторых вариантах осуществления пептидная последовательность Q-tag представляет собой внутренний реакционноспособный глутамин доступный для взаимодействия в результате аминокислотной замены. В других вариантах осуществления Q-tag слит с С-концом тяжелой цепи белка. В некоторых других вариантах осуществления по меньшей мере одна из по меньшей мере одной из пептидных последовательностей Q-tag выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-55.

[0447] В другом аспекте настоящего изобретения в настоящей заявке представлены антитела к нектину-4 формулы (B)



где:

каждый Q независимо представляет собой Q-tag, включающий пептидную последовательность с по меньшей мере одним глутаминовым остатком;

Ab представляет собой антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент; и

e представляет собой целое число от 1 до 20.

[0448] Антитела к нектину-4 формулы (B) могут быть предшественниками для конъюгатов антитело-олигонуклеотид формулы (A), описанной выше. Соответственно, свойства и варианты осуществления антител, которые описаны в предыдущем аспекте формулы (A), могут быть такими же или отличными от свойств и/или вариантов осуществления антител формулы (B).

[0449] В некоторых вариантах осуществления данного аспекта антитело к нектину-4 или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его фрагмент представляет собой Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab'-SH, Fv, scFv, однодоменное, содержащее только одну тяжелую цепь или содержащее только одну легкую цепь антитело или фрагмент антитела. В других вариантах осуществления антитело к нектину-4 или его фрагмент представляет собой гуманизированное, человеческое или химерное антитело, или его фрагмент.

[0450] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 и конъюгаты антител к нектину-4 включают Fc-область. В некоторых вариантах осуществления, где антитело к нектину-4 или конъюгат антитела к нектину-4 включает Fc-область, Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, выбранную из группы, состоящей из Fc-области IgG1, Fc-области IgG2 и Fc-области IgG4.

[0451] В некоторых вариантах осуществления данного аспекта Fc-область представляет собой:

(a) Fc-область IgG1 человека, включающую замены L234A, L235A и/или G237A, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом;

(b) Fc-область IgG2 человека, включающую замены A330S и/или P331S, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом; или

(c) Fc-область IgG4 человека, включающую замены S228P и/или L235E, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом.

[0452] В некоторых вариантах осуществления Fc-область дополнительно включает замену N297A, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом. В других вариантах осуществления Fc-область дополнительно включает замену D265A, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом. В некоторых других вариантах осуществления антитело к нектину-4 включает человеческую легкую цепь лямбда. В других вариантах осуществления антитело к нектину-4 включает человеческую легкую цепь каппа.

[0453] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один Q-tag присоединен к тяжелой цепи антитела к нектину-4. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один Q-tag слит с C-концом тяжелой цепи антитела к нектину-4. В других вариантах осуществления по меньшей мере один Q-tag присоединен к легкой цепи антитела к нектину-4. В некоторых других вариантах осуществления по меньшей мере один Q-tag находится в Fc-домене.

[0454] В некоторых вариантах осуществления данного аспекта антитело к нектину-4 связано с 1-20 Q-tag (Q). В некоторых вариантах осуществления количество Q-tag, связанных с конъюгатом антитела к нектину-4, представляет собой целое число около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19 или около 20. В некоторых других вариантах осуществления 1 или 2 Q-tag связан/связаны с антителом к нектину-4 или антигенсвязывающим фрагментом. В других вариантах осуществления количество Q-tag, связанных с конъюгатом антитела к нектину-4, представляет собой целое число от 1 до 10, от 10 до 20, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20 или от 1 до 5.

[0455] В других вариантах осуществления данного аспекта, которые можно комбинировать с любыми из описанных выше вариантов осуществления, каждый Q-tag независимо включает или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-55. В некоторых вариантах осуществления каждый Q-tag независимо включает или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из пептидных последовательностей Таблицы 16. В других вариантах осуществления данного аспекта каждый Q-tag независимо включает или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40-55. В других

вариантах осуществления каждый Q-tag независимо включает или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47-49. В некоторых вариантах осуществления Q-tag включает LLQGG (SEQ ID NO:172), GGGLLQGG (SEQ ID NO:173), RPQGF (SEQ ID NO:47) или RPQGFQPP (SEQ ID NO:49). В некоторых вариантах осуществления данного аспекта каждый Q независимо представляет собой Q-tag, включающий пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47). В некоторых вариантах осуществления каждый Q-tag, включающий пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), выбран из группы, состоящей из RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQGFPP (SEQ ID NO:48) и RPQGFQPP (SEQ ID NO:49). В некоторых вариантах осуществления каждый Q-tag независимо включает или представляет собой пептидную последовательность RPQGFQPP (SEQ ID NO:49).

[0456] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 по настоящему изобретению конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой цитотоксическое средство. Иллюстративные цитотоксические средства описаны в US 8088378 B2, содержание которого включено в настоящую заявку посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой метку.

[0457] В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой средство, которое модулирует иммунную систему. Например, такой фрагмент может целенаправленно воздействовать на функцию и/или модулировать функцию клетки, экспрессирующей нектин-4 на своей поверхности, как например, малая молекула, которая модулирует клеточный сигнальный путь клетки, экспрессирующей нектин-4, например, ингибитор IDO/TDO, ингибитор AhR, ингибитор аргиназы, ингибитор A2aR, агонисты TLR, агонист STING или агонист Rig-1. В некоторых вариантах осуществления этот фрагмент может рекрутировать другую макромолекулу или клетку в непосредственной близости от клетки, экспрессирующей нектин-4 на своей поверхности. В некоторых вариантах осуществления фрагмент включает цитокин, например IL2, IL7, IL-10, IL15 или IFN. В некоторых вариантах осуществления фрагмент (например, малая молекула) модулирует активность цитокина, например IL2, IL7, IL-10, IL15 или IFN. В некоторых вариантах осуществления фрагмент включает противораковую вакцину (включающую, например, ДНК, РНК, пептид или другой клеточный компонент(компоненты)).

[0458] В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 представляет собой биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 представляет собой мультиспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 представляет собой биспецифическое или мультиспецифическое антитело, включающее первый VL-домен и первый VH-домен, который специфически связывается нектином-4 человека, и по меньшей мере второй VL-домен и второй VH-домен, который специфически связывается с другой мишенью, отличной от нектин-4 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 представляет собой биспецифическое или мультиспецифическое антитело,

которое конъюгировано с терапевтическим средством, таким как олигонуклеотид, CpG олигонуклеотид или другое средство.

[0459] Когда антитело включает Fc-область, углевод, присоединенный к нему, может быть изменен. Например, антитела со зрелой углеводной структурой с отсутствием фукозы, связанной с Fc-областью антитела, описаны в US 2003/0157108. См. также US 2004/0093621. Антитела с разделяющимся пополам N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) в углеводе, присоединенном к Fc-области антитела, указаны в WO 2003/011878 и US 6602684. Антитела по меньшей мере с одним галактозным остатком в олигосахариде, присоединенном к Fc-области антитела, описаны в WO 1997/30087. См. также WO 1998/58964 и WO 1999/22764, касающиеся антител с измененным углеводом, присоединенным к их Fc-области. См. также US 2005/0123546, раскрывающий антигенсвязывающие молекулы с модифицированным гликозилированием.

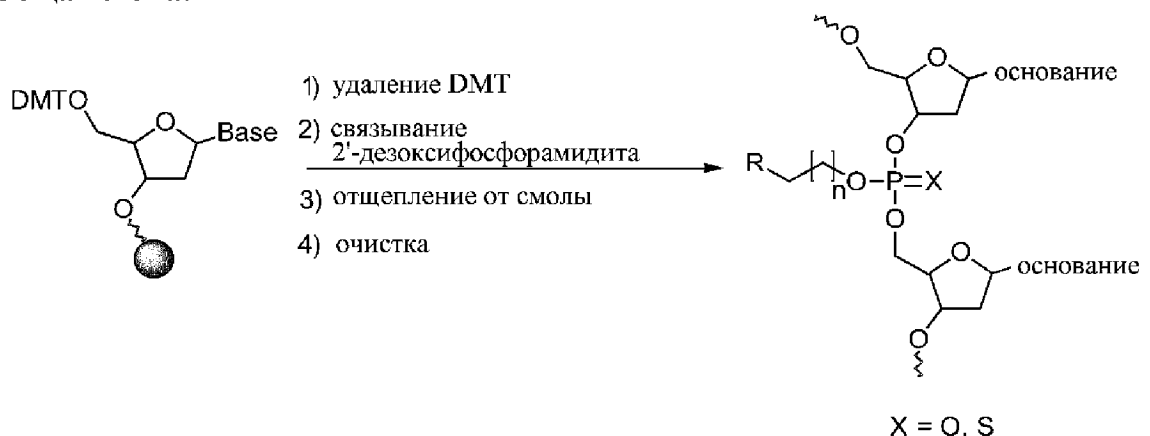
[0460] В некоторых вариантах осуществления вариант гликозилирования включает Fc-область, где углеводная структура, присоединенная к Fc-области, не содержит фукозы или имеет пониженное содержание фукозы. Такие варианты связаны с улучшенной ADCC функцией. Необязательно, Fc-область дополнительно включает одну или несколько аминокислотных замен, которые еще более улучшают ADCC, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-области (нумерация остатков в соответствии с EU-системой). Примеры публикаций, касающихся «дефукозилированных», «нефукозилированных», «афукозилированных» или «фукоза-дефицитных» антител, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, продуцирующих дефукозилированные антитела, включают Lec13 CHO клетки с дефицитом фукозилирования белка (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); патентная заявка США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно Пример 11), и клеточные линии с нокаутом, например гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, CHO клетки с нокаутом (Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)) и клетки, сверхэкспрессирующие  $\beta$ 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT-III) и  $\mu$ -маннозидазу Гольджи II (ManII). Другие способы получения дефукозилированных антител могут включать экспрессию в присутствии производных 2-фторфукозы или 5-алкинилфукозы в системах экспрессии, таких как клеточные линии (транзистентные или стабильные) (Okeley et al. *Appl. Biol. Sciences.* 110 (14) 5404-5409 (2013)).

[0461] В некоторых вариантах осуществления антитела к нектину-4 по изобретению или конъюгаты антител к нектину-4 имеют пониженное содержание фукозы по сравнению с количеством фукозы в том же антителе или конъюгате антитела, продуцируемом в клеточной линии, которая обеспечивает фукозилирование антитела,

такой как клеточная линия млекопитающего, например клеточная линия CHO дикого типа или клеточная линия HEK293. Например, антитело содержит меньшее количество фукозы, чем оно имело бы в случае, если бы оно продуцировалось нативными клетками CHO (например, клеткой CHO, которая продуцирует нативный паттерн гликозилирования, например, клеткой CHO, содержащей нативный ген FUT8). В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4, представленное в настоящей заявке, представляет собой антитело, в котором менее чем примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10%, примерно 5% или примерно 1% N-связанных гликанов включают фукозу. В некоторых вариантах осуществления антитело к нектину-4 или конъюгат антитела по настоящему изобретению является таким, в котором ни один из N-связанных гликанов не содержит фукозу, т.е. где антитело вообще не содержит фукозы, или не содержит никакой фукозы, или нефукозилировано, или афукозилировано. Количество фукозы можно определить путем расчета среднего количества фукозы в сахарной цепи Asn297 относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn297 (например, сложных, гибридных и имеющих высокое содержание маннозы структур), с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 означает аспарагиновый остаток, расположенный примерно в положении 297 в Fc-области (нумерация остатков Fc-области в соответствии с EU-системой); однако Asn297 также может быть расположен примерно на  $\pm 3$  аминокислоты выше или ниже от положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, из-за незначительных изменений последовательностей в антителах. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела нефукозилированы.

#### IV Общий синтез онуклеотидов:

##### **Общая схема:**



##### **Подробное описание эксперимента:**

[0462] Автоматический синтез олигонуклеотидов (в масштабе 1 мкмоль) осуществляли на MerMade 6 или 12 со следующими реагентами и растворителями:

Окислитель - 0,02M I<sub>2</sub> в смеси THF/пиридин/H<sub>2</sub>O (60-сек окисление на цикл),

Сульфурющий Реагент II - дитиазольное производное/пиридин/ацетонитрил (0,05 M, в 6:4 смеси пиридин:ацетонитрил) (60 сек на цикл)

Деблокирование - 3% трихлоруксусная кислота (2× 40-сек деблокирование на цикл),

Cap Mix A - THF/2,6-лутидин/As<sub>2</sub>O (60-сек кэппирование на цикл) и

Cap Mix B - 16% метилимидазол в THF (60-сек кэппирование на цикл)

[0463] Исключения из стандартных условий синтеза олигонуклеотидов были следующими:

- Использовали CPG носители с нуклеозидным линкером, называемым Uru-линкер.

- Все 2'-дезоксирибоза-фосфорамидиты ресуспендировали до 100 мМ в 100% безводном ацетонитриле перед синтезом, за исключением некоторых из модифицированных 2'-дезоксифосфорамидитов, которые растворяли до 100 мМ в смеси THF/ацетонитрил (1:4), в зависимости от растворимости исходного вещества.

- Активацию фосфорамидитов осуществляли с использованием 2,5-кратного молярного избытка 5-бензилтио-1Н-тетразола (ВТТ). Активированные 2'-дезоксирибоза-фосфорамидиты связывали (2× 1-мин связывание на одно введение) и модифицированные фосфорамидиты связывали (2× 3-мин связывание на одно введение).

- Сульфирование остова осуществляли с использованием 0,05М Сульфорирующего Реагента II в смеси пиридин/ацетонитрил (6:4) в течение 1 мин.

#### **Снятие защиты & протокол очистки олигонуклеотидов:**

[0464] После автоматического синтеза олигонуклеотидов твердофазный носитель и основные защитные группы (такие как A-Bz, C-Ac, G-iBu и т.д.) и метиловые эфиры фосфотриэфиров отщепляли и удаляли защиту в 1 мл АМА (1:1 соотношение 36% водного раствора аммиака и 40% метиламина в метаноле) в течение 2 ч или более при комнатной температуре с последующим упариванием путем центрифугирования.

[0465] Полученный осадок, представляющий собой неочищенные олигонуклеотиды, ресуспендировали в 100 мкл 50% ацетонитрила, быстро нагревали до 65°C и тщательно перемешивали вихревым способом.

[0466] Для очистки олигонуклеотидов 100 мкл неочищенных олигонуклеотидов инжигировали в ОФ-ВЭЖХ с использованием следующих буферов/градиента:

- Буфер А=50 мМ ТЕАА в воде;
- Буфер В=90% Ацетонитрила; и
- Скорость потока=1 мл/мин;
- Градиент:
  - 0-2 мин (100% Буфера А/0% Буфера В),
  - 2-42 мин (0% до 60% Буфера В) и
  - 42-55 мин (60% до 100% Буфера В).

#### **Конъюгация с DBCO и протокол очистки:**

[0467] DBCO NHS сложный эфир конъюгировали с неочищенным 2'-дезоксидМТ-олигонуклеотидом, как описано далее. Осажденный неочищенный олигонуклеотид суспендировали в 45 мкл DMSO, быстро нагревали до 65°C и тщательно перемешивали



вихревым способом. Добавляли 5 мкл DIPEA с последующим добавлением DBCO-NHS эфира (30 экв.), который предварительно растворяли в DMSO (1M). Реакционной смеси давали выстояться в течение 10 минут или до тех пор, пока MALDI анализ не подтвердил образование продукта. В общей сложности 80 мкл образцов неочищенных олигонуклеотидов инжестировали в ОФ-ВЭЖХ с использованием следующих буферов/градиента:

- Буфер А=50 mM TEAA в воде
- Буфер В=90% Ацетонитрила
- Скорость потока=1 мл/мин
- Градиент:
  - 0-2 мин (90% Буфера А/10% Буфера В)
  - 2-42 мин (0% до 60% Буфера В)
  - 42-55 мин (60% до 100% Буфера В).

[0468] По доминирующим пикам ОФ-ВЭЖХ собирали 0,5-мл фракции и анализировали методом масс-спектрометрии MALDI-TOF для подтверждения присутствия нужной массы. Очищенные фракции, отобранные по массе, замораживали и лиофилизировали. После сушки фракции ресуспендировали, объединяли с соответствующими фракциями, замораживали и лиофилизировали.

[0469] Отщепление DMT: лиофилизированные гранулы суспендировали в 20 мкл 50% ацетонитрила и добавляли 80 мкл уксусной кислоты, образцы выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч, замораживали и лиофилизировали. Высушенные образцы снова растворяли в 20% ацетонитриле и обессоливали на колонках NAP 10 (Sephadex<sup>TM</sup>-G25 DNA Grade). Собранные чистые фракции замораживали и лиофилизировали для получения конечного продукта.

#### Способы присоединения олигонуклеотидов к связывающему фрагменту

##### *Си-катализируемая клик-реакция*

##### *Получение комплекса медь-ТНРТА*

[0470] 5 mM водный раствор пентагидрата сульфата меди (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) и 10 mM водный раствор трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин (ТНРТА) смешивали в соотношении 1:1 (об/об) (молярное соотношение 1:2) и оставляли выстаиваться при комнатной температуре в течение 1 часа. Этот комплекс можно использовать для катализа циклоприсоединения по Хьюсгену, например, как показано на общих схемах конъюгации ниже.

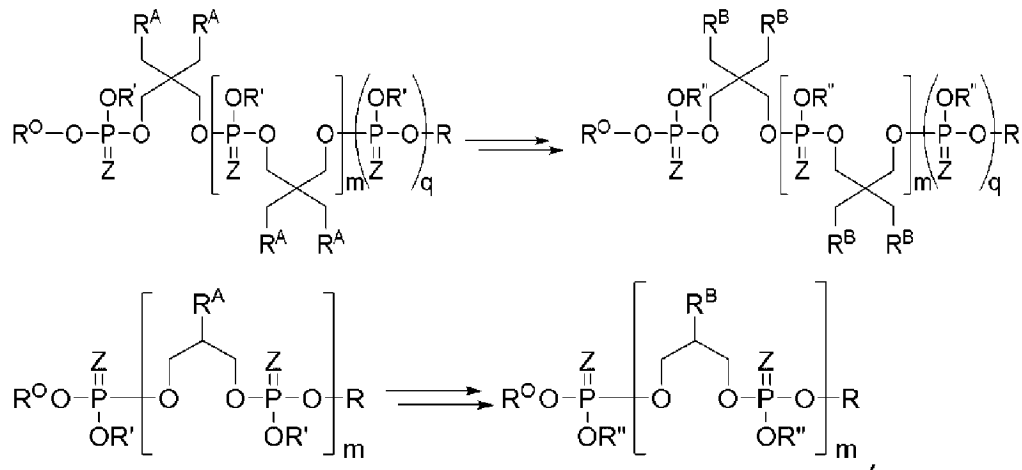
##### *Общая процедура (масштаб 100 нМ):*

[0471] К раствору 710 мкл воды и 100 мкл трет-бутанола (10% от конечного объема) в 1,7-мл пробирке Эппендорфа добавляли 60 мкл комплекса медь-ТНРТА, а затем 50 мкл 2 mM раствора олиго, 60 мкл 20 mM водного раствора аскорбата натрия и 20 мкл 10 mM раствора нацеливающего фрагмента-азида. После тщательного перемешивания раствору давали выстояться при комнатной температуре в течение 1 часа. Завершение реакции подтверждали гель-анализом. Реакционную смесь добавляли во флакон с

завинчивающейся крышкой, содержащий 5-10-кратный молярный избыток SiliaMetS® ТААсОНа (связанная со смолой натриевая соль EDTA). Смесь перемешивали в течение 1 часа. Эту смесь затем элюировали через illustra™Nap™-10 колонку Sephadex™. Полученный раствор затем замораживали и лиофилизировали в течение ночи.

*Присоединение через амидную связь:*

[0472] Конъюгацию посредством амидирования можно осуществить в условиях реакции амидирования, известных из уровня техники. См., например, Aaronson et al., *Bioconjugate Chem.* 22:1723-1728, 2011.



где

каждый  $q$  имеет значение 0 или 1;

каждый  $m$  представляет собой целое число от 0 до 5;

$Z$  представляет собой O или S;

$R^O$  представляет собой связь с нуклеозидом в олигонуклеотиде;

$R$  представляет собой связь с H, нуклеозидом в олигонуклеотиде, с твердофазным носителем или с кэп-группой (например,  $-(CH_2)_3-OH$ );

каждый  $R'$  независимо представляет собой H,  $-Q^1-Q^{A1}$ , биообратимую группу или небообратимую группу;

каждый  $R''$  независимо представляет собой H,  $-Q^1-Q^A-Q^1-T$ , биообратимую группу или небообратимую группу;

каждый  $R^A$  независимо представляет собой H или  $-OR^C$ , где  $R^C$  представляет собой  $-Q^1-Q^{A1}$ , биообратимую группу или небообратимую группу;

каждый  $R^B$  независимо представляет собой H или  $-OR^D$ , где  $R^D$  представляет собой  $-Q^1-Q^A-Q^2-T$ , биообратимую группу или небообратимую группу;

где

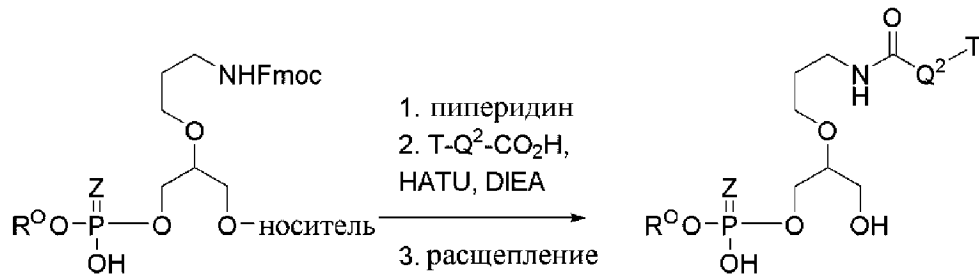
каждый  $Q^1$  независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную, четырехвалентную или пятивалентную группу, в которой одна валентность связана с  $Q^A$  или  $Q^{A1}$ , вторая валентность открыта, и каждая из оставшихся валентностей, если они присутствуют, независимо связана с вспомогательной группой;

каждый  $Q^2$  независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную,



T представляет собой связывающий фрагмент,  
при условии, что исходное вещество содержит  $-Q^1-NH_2$ , а продукт содержит  $-Q^1-NH-CO-Q^2-T$ .

[0474] Присоединение на носителе:

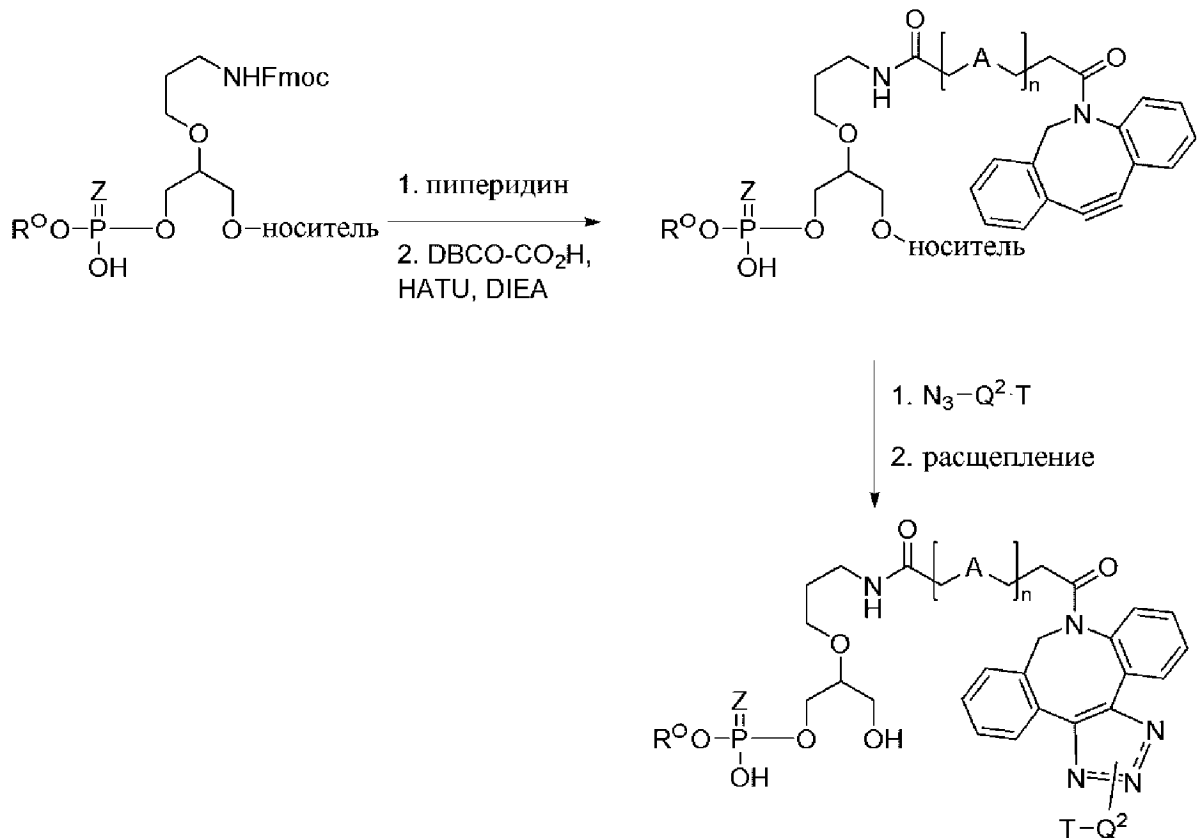


Z представляет собой O или S;

R<sup>O</sup> представляет собой связь с нуклеозидом в олигонуклеотиде;

каждый Q<sup>2</sup> независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную, четырехвалентную или пятивалентную группу, в которой одна валентность связана с  $-NH-CO-$ , вторая валентность представляет собой связь с T, и каждая из оставшихся валентностей, если они присутствуют, независимо связана с вспомогательной группой; и

T представляет собой связывающий фрагмент.



где

n представляет собой целое число от 1 до 8;

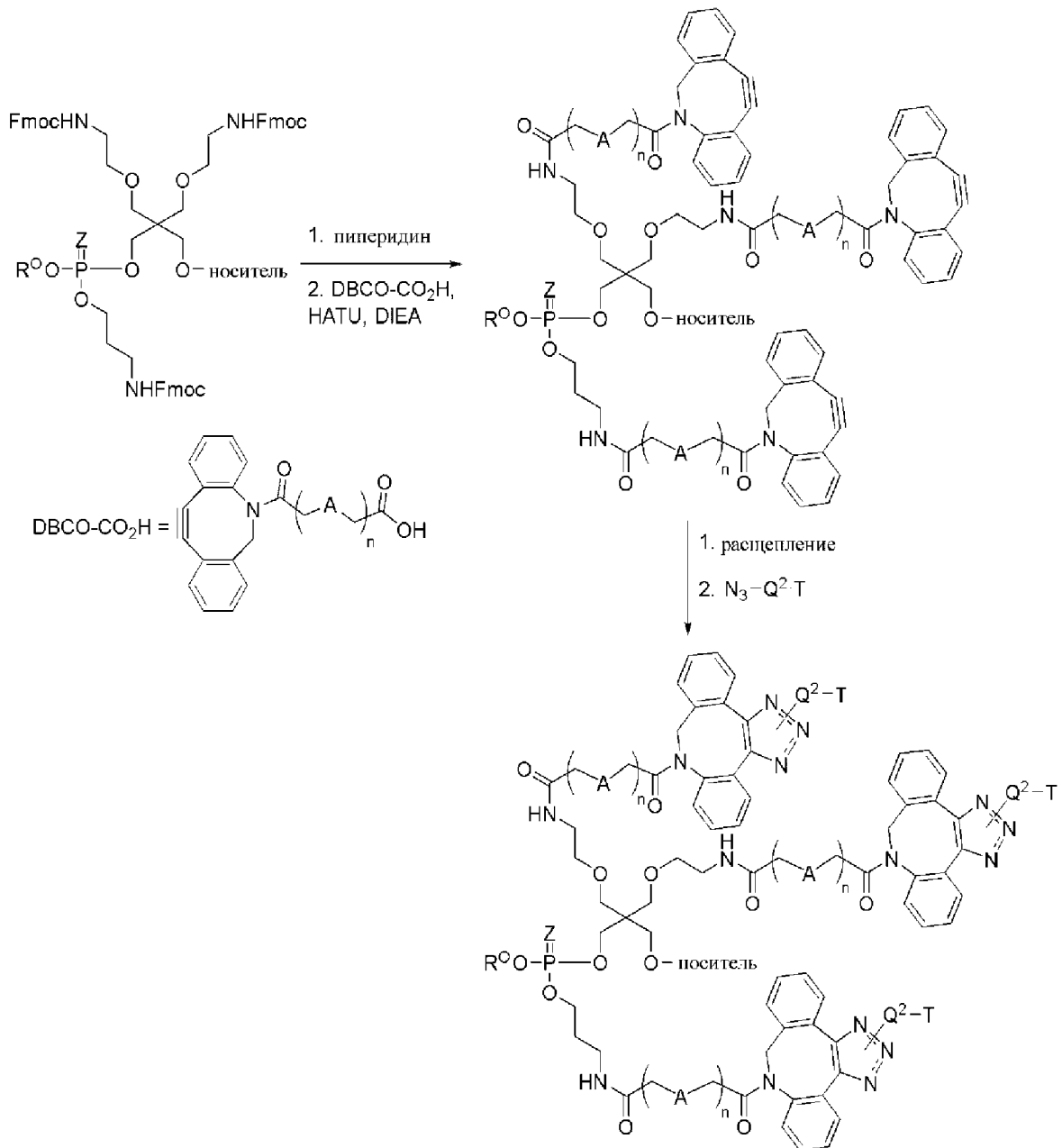
A представляет собой O или  $-CH_2-$ ;

Z представляет собой O или S;

$R^O$  представляет собой связь с нуклеозидом в олигонуклеотиде;

каждый  $Q^2$  независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную, четырехвалентную или пятивалентную группу; в которой одна валентность связана с азидом или триазолом, вторая валентность связана с T, и каждая из оставшихся валентностей, если они присутствуют, независимо связана с вспомогательной группой; и

T представляет собой связывающий фрагмент.



где

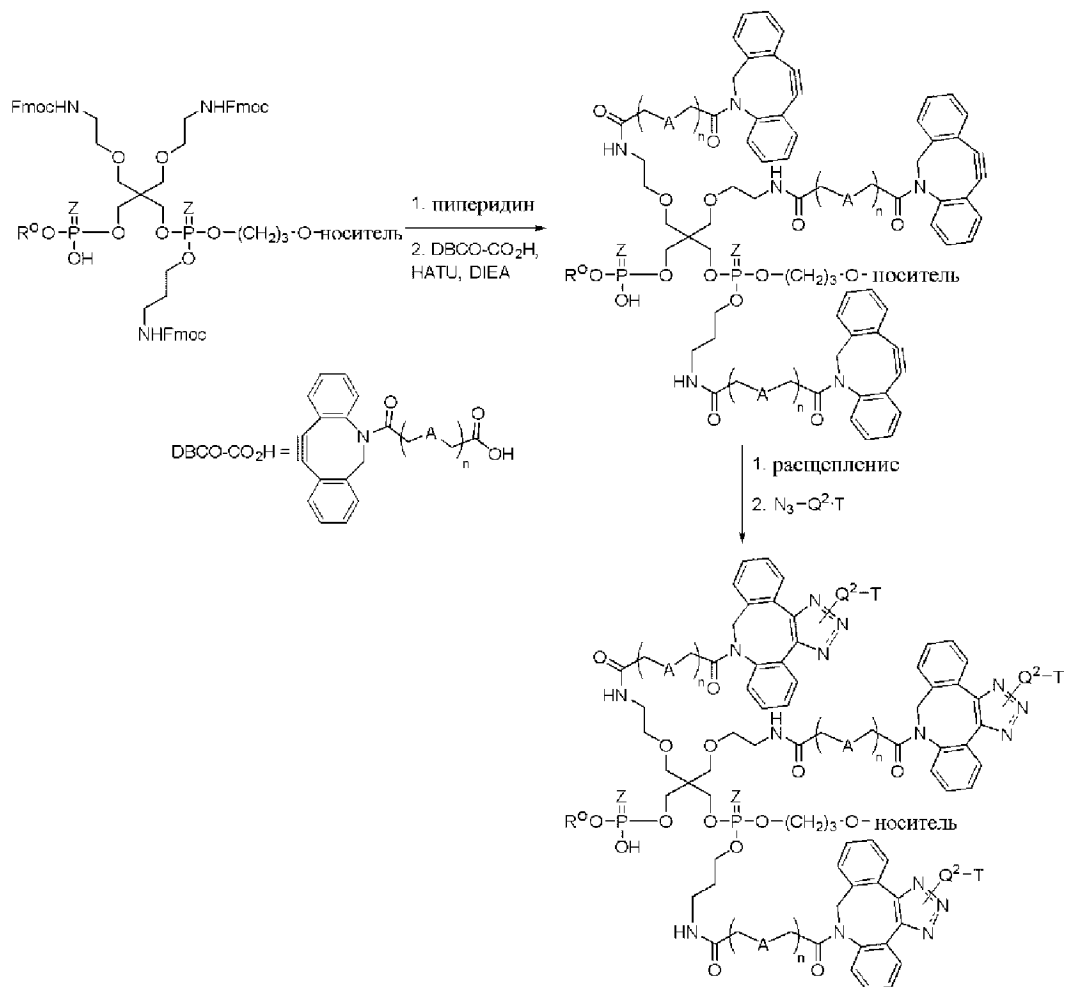
n представляет собой целое число от 1 до 8;

A представляет собой O или -CH<sub>2</sub>-;

Z представляет собой O или S;

$R^O$  представляет собой связь с нуклеозидом в олигонуклеотиде;

каждый  $Q^2$  независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную, четырехвалентную или пятивалентную группу; в которой одна валентность связана с азидом или триазолом, вторая валентность связана с T, и каждая из оставшихся валентностей, если они присутствуют, независимо связана с вспомогательной группой; и T представляет собой связывающий фрагмент.



где

n представляет собой целое число от 1 до 8;

A представляет собой O или -CH<sub>2</sub>-;

Z представляет собой O или S;

R<sup>O</sup> представляет собой связь с нуклеозидом в олигонуклеотиде;

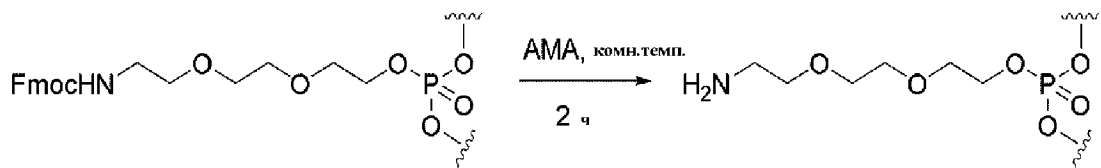
каждый  $Q^2$  независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную, четырехвалентную или пятивалентную группу; в которой одна валентность связана с азидом или триазолом, вторая валентность связана с T, и каждая из оставшихся валентностей, если они присутствуют, независимо связана с вспомогательной группой; и каждый T независимо представляет собой связывающий фрагмент.

#### Репрезентативный пример удаления Fmoc-защиты фосфотриэфира:

[0475] Олигонуклеотид, включающий фосфотриэфир с Fmoc-защищенным амином, подвергали условиям снятия защиты, приводящим к удалению Fmoc-защиты без

наблюдаемого преобразования фосфотриэфира в фосфодиэфир.

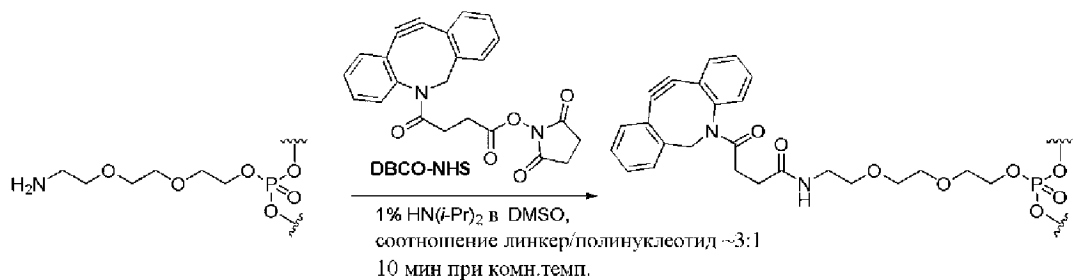
TCCATGACGTTCCTGACGTT (SEQ ID NO:176)



**Конъюгация DBCO-NHS с TCCATGACGTTCCTGACGTT (SEQ ID NO:176)-**

**Репрезентативный пример:**

[0476] Конъюгация DBCO-NHS с аминогруппой в фосфотриэфире завершилась в течение 10 мин при комнатной температуре, как показал масс-спектрометрический анализ.



[0477] ОФ-ВЭЖХ очистку TCCATGACGTTCCTGACGTT (SEQ ID NO:176), содержащего DBCO конъюгирующую группу, осуществляли с использованием следующих условий:

- Буфер А=50 мМ ТЕАА в воде;
- Буфер В=90% Ацетонитрила; и
- Скорость потока=1 мл/мин;
- Градиент:
  - 0-2 мин (100% Буфера А/0% Буфера В),
  - 2-22 мин (0% до 100% Буфера В), и
  - 22-25 мин (100% Буфера В).

[0478] Подобную процедуру можно использовать для получения олигонуклеотида с использованием, например, 2'-модифицированных нуклеозидфосфорамидитов, таких как описанные в настоящей заявке. Такая процедура представлена в международной патентной заявке РСТ/US2015/034749; раскрытие синтеза олигонуклеотидов с дисульфид фосфотриэфиром в РСТ/US2015/034749 включено в настоящую заявку посредством ссылки.

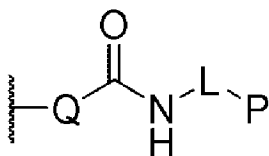
## V. СПОСОБЫ КОНЪЮГАЦИИ

[0479] В настоящей заявке представлены способы получения конъюгата, включающего антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов, связанных через один или несколько Q-tag пептидов, как показано в структуре формулы (А). В некоторых вариантах осуществления способы включают объединение антитела к нектину-4, включающего по

меньшей мере одну пептидную последовательность Q-tag с по меньшей мере одним доступным для взаимодействия глутаминовым остатком, и олигонуклеотида в условиях, достаточных для индукции конъюгации, *т.е.* реакции амидирования между CpG и Q-tag. В других вариантах осуществления способы включают взаимодействие антитела к нектину-4, включающего по меньшей мере одну пептидную последовательность Q-tag с по меньшей мере одним доступным для взаимодействия глутаминовым остатком, и олигонуклеотида в химических условиях, достаточных для индукции конъюгации. В некоторых других вариантах осуществления способы включают взаимодействие антитела к нектину-4, включающего по меньшей мере одну пептидную последовательность Q-tag с по меньшей мере одним доступным для взаимодействия глутаминовым остатком, и олигонуклеотида в ферментативных условиях, например с транsgлутаминазой, достаточных для индукции конъюгации.

Условия транsgлутаминаза-опосредованной реакции конъюгации

[0480] В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ получения конъюгата формулы (A), включающий связывание одного или нескольких иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P) и антитела к нектину-4, включающего один или несколько глутаминовых остатков. В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ получения конъюгата, включающего антитело к нектину-4 или антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело к нектину-4 или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), включающими аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A),



(A),

где:

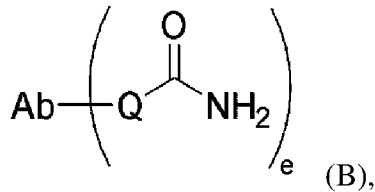
~~~~~ указывает точку присоединения каждого Q к антителу к нектину-4 или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, связанную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

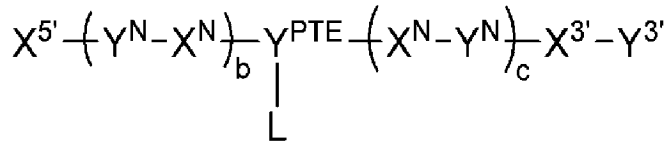
каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, включающий контактирование соединения формулы (B)





где Ab и Q имеют значение, определенное для формулы (A) выше, и e представляет собой целое число от 1 до 20,

с одним или несколькими иммуномодулирующими олигонуклеотидами P, где каждый P независимо имеет следующую формулу:



где

X<sup>5'</sup> представляет собой 5'-концевой нуклеозид;

X<sup>3'</sup> представляет собой 3'-концевой нуклеозид;

Y<sup>PTE</sup> представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир;

Y<sup>3'</sup> представляет собой концевой фосфотриэфир;

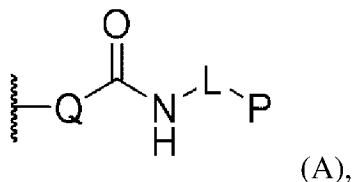
каждый X<sup>N</sup> независимо представляет собой нуклеозид;

каждый Y<sup>N</sup> независимо представляет собой межнуклеозидный линкер;

b и c каждый независимо представляет собой целое число от 1 до 25; при условии, что сумма b и c равна по меньшей мере 5; и

L представляет собой линкерную группу, включающую концевой амин, в присутствии трансглутаминазы.

[0481] В другом аспекте способ получения конъюгата, включающего антитело к нектину-4 или антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело к нектину-4 или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), включающими по меньшей мере один глутаминовый остаток, и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A),



где:

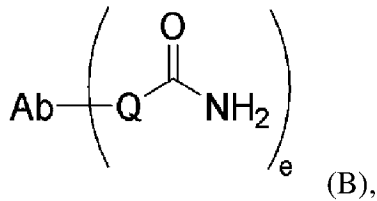
--- указывает точку присоединения каждого Q к антителу к нектину-4 или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо представляет собой Q-tag пептид, включающий по меньшей

мере один глутаминовый остаток;

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, связанную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид; включает контактирование соединения формулы (B)



где Ab и Q имеют значение, определенное для формулы (A) выше, и e представляет собой целое число от 1 до 20,

с одним или несколькими иммуномодулирующими олигонуклеотидами P, где каждый олигонуклеотид P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C) или формулы (D), в присутствии трансглутаминазы.

[0482] В некоторых вариантах осуществления конъюгат включает один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более, или двадцать или более Q-tag пептидов. В некоторых вариантах осуществления конъюгат включает один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или двадцать Q-tag пептидов. В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит 2 Q-tag пептида. В некоторых вариантах осуществления конъюгат включает один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более, или двадцать или более иммуномодулирующих олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления конъюгат включает один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или двадцать иммуномодулирующих олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит один иммуномодулирующий олигонуклеотид.

[0483] В другом аспекте способ включает связывание соединения формулы (C) и антитела к нектину-4 формулы (B), включающего один или несколько глутаминовых остатков, в присутствии трансглутаминазы. В некоторых вариантах осуществления способ включает контактирование соединения формулы (D) и антитела к нектину-4 формулы (B), включающего один или несколько глутаминовых остатков, в присутствии трансглутаминазы. В некоторых вариантах осуществления конечная концентрация соединения формулы (C) или формулы (D) находится в диапазоне около 1-100 мкМ. В некоторых вариантах осуществления конечная концентрация включающего Q-tag антитела находится в диапазоне около 1-500 мкМ. В некоторых вариантах осуществления конечная концентрация трансглутаминазы находится в диапазоне около 1-500 мкМ. В некоторых вариантах осуществления конечная концентрация трансглутаминазы находится в диапазоне около 1-50 мкМ, около 50-100 мкМ, около 100-150 мкМ, около 150-200 мкМ,

около 200-250 мкМ, около 250-300 мкМ, около 300-400 мкМ, около 400-500 мкМ, около 100-125 мкМ, около 125-150 мкМ, около 150-175 мкМ, около 175-200 мкМ, около 200-225 мкМ, около 225-250 мкМ, около 250-275 мкМ, около 275-300 мкМ, около 300-325 мкМ или около 325-350 мкМ.

[0484] В некоторых вариантах осуществления соотношение включающего Q-tag антителя и соединения формулы (C) или формулы (D) находится в диапазоне около 1:1-250:1, около 1:1-5:1, около 5:1-10:1, около 10:1-20:1, около 20:1-30:1, около 30:1-40:1, около 40:1-50:1, около 50:1-75:1, около 75:1-100:1, около 100:1-150:1, около 150:1-200:1, около 200:1-250:1, около 1:1-25:1, около 25:1-50:1, около 50:1-75:1, около 75:1-100:1 или около 100:1-250:1, в расчете на массу. В некоторых вариантах осуществления соотношение соединения формулы (C) или формулы (D) и антителя составляет около 1:1, около 2:1, около 3:1, около 4:1, около 5:1, около 6:1, около 7:1, около 8:1, около 9:1, около 10:1, около 11:1, около 12:1, около 13:1, около 14:1, около 15:1, около 16:1, около 17:1, около 18:1 или около 20:1, в расчете на молярность.

[0485] В некоторых вариантах осуществления соотношение включающего Q-tag антителя и трансклутаминазы находится в диапазоне около 1:1-500:1, около 1:1-5:1, около 5:1-10:1, около 10:1-20:1, около 20:1-30:1, около 30:1-40:1, около 40:1-50:1, около 50:1-75:1, около 75:1-100:1, около 100:1-150:1, около 150:1-200:1, около 200:1-250:1, около 1:1-25:1, около 25:1-50:1, около 50:1-75:1, около 75:1-100:1, около 100:1-150:1, около 150:1-200:1, около 200:1-250:1, около 250:1-300:1, около 300:1-400:1 или около 400:1-500:1, в расчете на массу. В некоторых вариантах осуществления соотношение пептида и трансклутаминазы составляет около 15:1, около 16:1, около 17:1, около 18:1, около 20:1, около 21:1, около 22:1, около 23:1, около 24:1, около 25:1, около 26:1, около 27:1, около 28:1, около 29:1, около 30:1, около 31:1, около 32:1, около 33:1, около 34:1, около 35:1, около 36:1, около 37:1, около 38:1, около 39:1, около 40:1, около 41:1, около 42:1, около 43:1, около 44:1, около 45:1, около 46:1, около 47:1, около 48:1, около 49:1 или около 50:1, в расчете на молярность.

[0486] В некоторых вариантах осуществления соотношение Q-tag:СpG:трансклутаминаза составляет около 1:1,3:10. В некоторых вариантах осуществления соотношение Q-tag:СpG:трансклутаминаза составляет около 1:1,5:10. В некоторых вариантах осуществления соотношение Q-tag:СpG:трансклутаминаза составляет около 1:1,3:15.

[0487] В некоторых вариантах осуществления реакцию инкубируют при температуре выше 15°C, выше 20°C, выше 25°C, выше 30°C, выше 35°C, выше 40°C, выше 45°C или выше 50°C. В некоторых вариантах осуществления реакцию инкубируют при температуре около комнатной температуры. В некоторых вариантах осуществления реакцию инкубируют в течение по меньшей мере 10 минут, 20 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 15 часов, 20 часов, 25 часов, 30 часов, 35 часов, 40 часов, 45 часов, 50 часов или 60 часов.

[0488] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящей

заявке, обеспечивает соединение формулы (A) при более чем примерно 5%, более чем примерно 10%, более чем примерно 15%, более чем примерно 20%, более чем примерно 25%, более чем примерно 30%, более чем примерно 35%, более чем примерно 40%, более чем примерно 45%, более чем примерно 50%, более чем примерно 60%, более чем примерно 70%, более чем примерно 80%, более чем примерно 90%, более чем примерно 95%, более чем примерно 97% или более чем примерно 99% по сравнению с пептидом.

[0489] В некоторых вариантах осуществления рН реакции находится в диапазоне около 4-10. В некоторых вариантах осуществления рН реакции находится в диапазоне около 4-6, около 6-8 или около 8-10. В некоторых вариантах осуществления рН реакции находится в диапазоне около 7-8.

[0490] В другом аспекте реакции, полезные для присоединения связывающего фрагмента к олигонуклеотиду известны из уровня техники, включая, но не ограничиваясь этим, циклоприсоединение по Хьюсгену (металл-катализируемое или без металла) между азидо и конъюгирующей группой на основе алкина (*например*, необязательно замещенным  $C_{6-16}$  гетероциклиленом, содержащим эндоциклическую углерод-углеродную тройную связь, или необязательно замещенным  $C_{8-16}$  циклоалкинилом) с образованием триазольной группы; реакцию Дильса-Альдера между диенофилом и диен/гетеродиеном; образование связей посредством перициклических реакций, таких как еновая реакция; образование амидной или тиоамидной связи; образование сульфонамидной связи (*например*, с азидосоединениями); алкилирование спирта или фенола (*например*, алкилирование по Уильямсону), реакции конденсации с образованием оксимной, гидразоновой или семикарбазидной группы; реакции сопряженного присоединения посредством нуклеофилов (*например*, аминов и тиолов); образование дисульфидной связи; и нуклеофильное замещение (*например*, амином, тиолом или гидроксильным нуклеофилом) по карбонилу (*например*, по активированному эфиру карбоновой кислоты, такому как пентафторфениловый (PFP) эфир или тетрафторфениловый (TFP) эфир) или по электрофильному арену (*например*,  $SN_{Ar}$  по олигофторированному арену, фторбензонитрильной группе или фторнитробензольной группе).

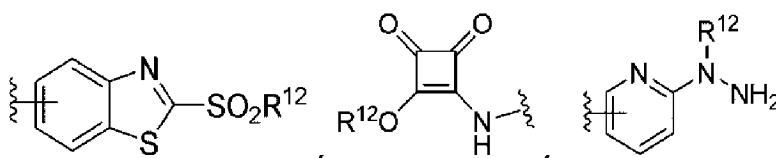
[0491] В некоторых вариантах осуществления реакция присоединения представляет собой диполярное циклоприсоединение, и группа для конъюгации включает азидо, необязательно замещенный  $C_{6-16}$  гетероциклилен, содержащий эндоциклическую тройную углерод-углеродную связь, или необязательно замещенный  $C_{8-16}$  циклоалкинил. Комплементарную реакционноспособную группу и конъюгирующую группу выбирают по их взаимной комплементарности. *Например*, азид используется в одной из конъюгирующей группы и дополнительной реакционноспособной группы, тогда как алкин используется в другой из конъюгирующей группы и комплементарной реакционноспособной группы.

#### Присоединение связывающего фрагмента к олигонуклеотиду

[0492] Связывающий фрагмент можно присоединить к олигонуклеотиду путем образования связи между присоединяющейся группой в олигонуклеотиде и

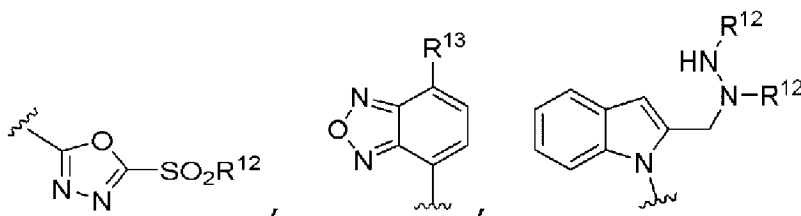
комплементарной реакционноспособной группой, связанной со связывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент модифицируют для включения комплементарной реакционноспособной группы. Способы введения таких комплементарных реакционноспособных групп в связывающий фрагмент известны из уровня техники.

[0493] В некоторых вариантах осуществления комплементарная реакционноспособная группа представляет собой необязательно замещенный C<sub>2-12</sub> алкинил, необязательно замещенный N-защищенный amino, азидо, N-малеимида, S-



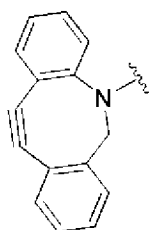
защищенный тиол,

или его N-



защищенный фрагмент,

необязательно замещенный C<sub>6-16</sub> гетероцикл, содержащий эндоциклическую углерод-



углеродную тройную связь (например,

), 1,2,4,5-тетразиновую группу



(например,

или

), необязательно



замещенный C<sub>8-16</sub> циклоалкинил (например,

), -NHR<sup>N1</sup>, необязательно

замещенный C<sub>4-8</sub> напряженный циклоалкенил (например, *транс*-циклооктенил или норборненил) или необязательно замещенный C<sub>1-16</sub> алкил, содержащий -COOR<sup>12</sup> или -CHO;

где:

R<sup>N1</sup> представляет собой H, N-защитную группу или необязательно замещенный C<sub>1-6</sub> алкил;

каждый  $R^{12}$  независимо представляет собой H, необязательно замещенный  $C_{1-6}$  алкил или O-защитную группу (например, карбокси-защитную группу); и  $R^{13}$  представляет собой галоген (например, F).

[0494] В некоторых вариантах осуществления комплементарная реакционноспособная группа является защищенной вплоть до реакции конъюгации. Например, комплементарная реакционноспособная группа, которая является защищенной, может включать  $-COOR^{PGO}$  или  $-NHR^{PGN}$ , где  $R^{PGO}$  представляет собой O-защитную группу (например, карбокси-защитную группу) и  $R^{PGN}$  представляет собой N-защитную группу.

## VI. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

[0495] Антитела к нектину-4 и конъюгаты по настоящему изобретению, такие как конъюгаты, включающие структуры формулы (A), антитела формулы (B) и иммуномодулирующие олигонуклеотиды формул (C), (C'), (C''), (D), (D') и (D''), или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных или любую их подгруппу можно формулировать в различные фармацевтические формы для целей введения. В качестве подходящих композиций можно указать все композиции, обычно используемые для системного введения лекарственных средств. Для получения фармацевтических композиций по настоящему изобретению эффективное количество конкретного соединения, необязательно в форме соли, в качестве активного ингредиента объединяют в смеси с фармацевтически приемлемым носителем, причем этот носитель может принимать самые разнообразные формы в зависимости от формы препарата, желаемого для введения. Эти фармацевтические композиции желательны в стандартной лекарственной форме, подходящей, в частности, для перорального, ректального, чрескожного введения или парентеральной инъекции. Например, при получении композиций в лекарственной форме для перорального введения можно использовать любую обычную фармацевтическую среду, такую как, например, вода, гликоли, масла, спирты и т.п. в случае жидких препаратов для перорального введения, таких как суспензии, сиропы, эликсиры, эмульсии и растворы; или твердые носители, такие как крахмалы, сахара, каолин, смазывающие вещества, связующие, разрыхлители и т.п., в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток. Из-за простоты введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее выгодные стандартные лекарственные формы для перорального введения, и в этом случае используют твердые фармацевтические носители. Для парентеральных композиций носитель обычно включает стерильную воду, по меньшей мере в значительной степени, хотя могут быть включены и другие ингредиенты, например, для улучшения растворимости. Например, можно получить растворы для инъекций, в которых носитель включает физиологический раствор, раствор глюкозы или смесь физиологического раствора и раствора глюкозы. Также можно получить суспензии для инъекций, и в этом случае можно использовать соответствующие жидкие носители, суспендирующие агенты и т.п. Также включены препараты в твердой форме, предназначенные для преобразования, непосредственно перед применением, в препараты

в жидкой форме. В композициях, подходящих для чрескожного введения, носитель необязательно включает агент, усиливающий проникновение, и/или подходящий смачивающий агент, необязательно в сочетании с подходящими добавками любой природы в незначительных пропорциях, причем эти добавки не оказывают значительного вредного воздействия на кожу. Соединения по настоящему изобретению также можно вводить посредством пероральной ингаляции или инсуффляции в форме раствора, суспензии или сухого порошка с использованием любой известной в данной области системы доставки.

[0496] Особенно выгодно, когда формулировать вышеуказанные фармацевтические композиции сформулированы в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и однородности дозирования. Стандартная лекарственная форма, как используется в настоящей заявке, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве дозированных единиц, причем каждая единица содержит заранее определенное количество активного ингредиента, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Примерами таких стандартных лекарственных форм являются таблетки (включая таблетки с насечкой или покрытые оболочкой), капсулы, пилюли, суппозитории, пакеты с порошком, облатки, растворы или суспензии для инъекций и т.п., а также их отдельные кратные единицы.

[0497] Введение может быть, но не ограничивается этим, внутривенным, внутриартериальным, подкожным, интраперитонеальным, субдермальным (например, через имплантированное устройство) и интрапаренхиматозным. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящей заявке, вводят путем подкожной инъекции.

[0498] Фармацевтические композиции, включающие описанный в настоящей заявке конъюгат, можно доставлять в клетку, группу клеток, опухоль, ткань или субъекту с использованием технологий доставки, известных в данной области. В общем, любой подходящий способ, известный в данной области техники, для доставки конъюгата нуклеиновая кислота-белок (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для использования с описанными в настоящей заявке композициями. Например, доставка может осуществляться путем локального введения (например, прямой инъекции, имплантации или местного введения), системного введения или подкожным, внутривенным, интраперитонеальным или парентеральным путями, включая интракраниальное (например, интравентрикулярное, интрапаренхиматозное и интратекальное), внутримышечное, трансдермальное, через дыхательные пути (аэрозоль), назальное, пероральное, ректальное или местное (включая буккальное и сублингвальное) введение. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят путем подкожной или внутривенной инфузии или инъекции.

[0499] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления описанные в настоящей заявке фармацевтические композиции могут включать один или несколько

фармацевтически приемлемых эксципиентов. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящей заявке фармацевтические композиции могут быть сформулированы для введения субъекту.

[0500] В контексте настоящей заявки фармацевтическая композиция или лекарственное средство включает фармакологически эффективное количество по меньшей мере одного из описанных терапевтических соединений или конъюгатов и один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов. Фармацевтически приемлемые эксципиенты (эксципиенты) представляют собой вещества, отличные от активного фармацевтического ингредиента (API, терапевтический продукт), которые специально включают в систему доставки лекарственного средства. Эксципиенты не оказывают или не предназначены для оказания терапевтического эффекта в назначенной дозировке. Эксципиенты могут действовать, чтобы а) способствовать обработке системы доставки лекарственного средства во время изготовления, б) защищать, поддерживать или повышать стабильность, биодоступность или приемлемость API для пациентов, с) способствовать идентификации продукта, и/или d) улучшать любое другое свойство, связанное с общей безопасностью и эффективностью доставки API, во время хранения или использования. Фармацевтически приемлемый эксципиент может быть, или не быть, инертным веществом.

[0501] Эксципиенты включают, но не ограничиваются этим: усилители абсорбции, антиадгезивы, пеногасители, антиоксиданты, связующие, буферные агенты, носители, покрывающие агенты, красители, усилители доставки, полимеры для доставки, декстран, декстрозу, разбавители, разрыхлители, эмульгаторы, сухие разбавители, наполнители, ароматизаторы, глиданты, увлажнители, смазывающие вещества, масла, полимеры, консерванты, физиологический раствор, соли, растворители, сахара, суспендирующие агенты, матрицы для пролонгированного высвобождения, подсластители, загустители, регулирующие тоничность агенты, растворители, водоотталкивающие и смачивающие агенты.

[0502] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимы) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Stomphor EL<sup>TM</sup> (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буферный раствор. Они должны быть стабильными в условиях изготовления и хранения и защищены от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Во



многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, и хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъеклируемых композиций может достигаться путем включения в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

[0503] Стерильные растворы для инъекций можно получить путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в зависимости от необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов способы приготовления включают вакуумную сушку и лиофилизацию, которая дает порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

[0504] Композиции, подходящие для интраартикулярного введения, могут быть в виде стерильного водного препарата лекарственного средства, который может находиться в микрокристаллической форме, например, в виде водной микрокристаллической суспензии. Липосомальные композиции или биоразлагаемые полимерные системы также можно использовать для представления лекарственного средства как для внутрисуставного, так и для офтальмологического введения.

[0505] Активные соединения можно подготовить с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, например, в препаратах с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких композиций будут очевидны специалистам в данной области. Липосомальные суспензии также можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получить способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811.

[0506] Соединение или конъюгат можно сформулировать в композиции в единичной дозированной форме для простоты введения и однородности дозирования. Единичная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для обеспечения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация для единичных дозированных форм по настоящему изобретению продиктована и напрямую зависит от уникальных

характеристик активного соединения и терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, а также от ограничений, присущих области составления композиций такого активного соединения для лечения индивидуумов.

[0507] Фармацевтическая композиция может содержать другие дополнительные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях. Такие дополнительные компоненты включают, но не ограничиваются этим: противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства (например, антигистаминовое средство, дифенгидрамин и т.д.).

[0508] Обычно эффективное количество активного соединения будет в диапазоне от около 0,1 до около 100 мг/кг массы тела/день, например, от около 1,0 до около 50 мг/кг массы тела/день. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество активного соединения будет в диапазоне от около 0,25 до около 5 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество активного соединения будет в диапазоне 25-400 мг в расчете на 1-18 недель или 1-6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество активного соединения будет в диапазоне 50-125 мг в расчете на 4 недели или на один месяц. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество активного ингредиента будет в диапазоне от около 0,5 до около 3 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество активного ингредиента будет в диапазоне около 25-400 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество активного ингредиента будет в диапазоне около 50-125 мг на дозу. Вводимое количество также, вероятно, будет зависеть от таких переменных, как общее состояние здоровья пациента, относительная биологическая эффективность доставляемого соединения, композиция лекарственного средства, наличие и типы эксципиентов в композиции и путь введения. Также следует понимать, что начальная вводимая доза может быть увеличена и превышать указанный выше верхний предел, чтобы быстро достичь желаемого уровня в крови или ткани, или начальная доза может быть меньше оптимальной.

[0509] Для лечения заболевания или для получения лекарственного средства или композиции для лечения заболевания фармацевтические композиции, описанные в настоящей заявке, включающие антитело к нектину-4 или конъюгат, можно комбинировать с эксципиентом или со вторым терапевтическим средством или лечением, включая, но не ограничиваясь этим: второй или другие конъюгаты, низкомолекулярное лекарственное средство, антитело, фрагмент антитела и/или вакцину.

[0510] Описанные антитела к нектину-4 или конъюгаты, когда они добавлены к фармацевтически приемлемым эксципиентам или адъювантам, могут быть упакованы в наборы, контейнеры, упаковки или дозаторы. Описанные в настоящей заявке фармацевтические композиции могут быть упакованы в предварительно заполненные шприцы или флаконы.

## **VII. НАБОРЫ**

[0511] Также настоящим изобретением обеспечивается набор, включающий

конъюгат, описанный выше.

[0512] В другом аспекте набор дополнительно включает листок-вкладыш, включая, без ограничения, соответствующие инструкции по приготовлению и введению композиции, информацию о побочных эффектах композиции и любую другую соответствующую информацию. Инструкции могут быть в любом подходящем формате, включая, но не ограничиваясь этим, печатный материал, видеокассету, машиночитаемый диск, оптический диск или указания к инструкциям в интернете.

[0513] В другом аспекте обеспечиваются наборы для лечения субъекта, который страдает или восприимчив к состояниям, описанным в настоящей заявке, включающие первый контейнер, включающий дозированное количество композиции или препарата, раскрытых в настоящей заявке, и листок-вкладыш, касающийся применения. Контейнер может быть любым из известных в данной области техники и подходящим для хранения и доставки внутривенной композиции. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно включает второй контейнер, включающий фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, адъювант и т.д. для получения композиции, предназначенной для введения субъекту.

[0514] В другом аспекте также могут обеспечиваться наборы, содержащие достаточные дозы описанных в настоящей заявке композиций (включая фармацевтические композиции) для обеспечения эффективного лечения субъекта в течение длительного периода времени, такого как 1-3 дня, 1-5 дней, неделя, 2 недели, 3, недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель, 1 цикл, 2 цикла, 3 цикла, 4 цикла, 5 циклов, 6 циклов, 7 циклов, 8 циклов или более.

[0515] В некоторых вариантах осуществления наборы также могут включать несколько доз и могут быть упакованы в количествах, достаточных для хранения и использования в аптеках, например, в больничных аптеках и в рецептурных аптеках. В некоторых вариантах осуществления наборы могут включать дозированное количество по меньшей мере одной композиции, раскрытой в настоящей заявке.

### **VIII. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ**

[0516] Также в настоящей заявке предложены способы для лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества описанного в настоящей заявке антитела к нектину-4 или конъюгата. Также в настоящей заявке предложены применения описанного в настоящей заявке антитела к нектину-4 или конъюгата для получения лекарственного средства для лечения пациента, нуждающегося в лечении с использованием олигонуклеотида в конъюгате. Также предложены антитела к нектину-4 или конъюгаты, описанные в настоящей заявке, для лечения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в лечении с использованием олигонуклеотида в антителах к нектину-4 или конъюгатах. Также предложены антитела к нектину-4 или конъюгаты, описанные в настоящей заявке, для лечения пациента, включающего введение пациенту эффективного количества антитела к нектину-4 или конъюгата. В некоторых вариантах осуществления у субъекта

имеется рак или риск его развития. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой вирусную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления заболевание вызвано расстройством иммунной системы.

[0517] В некоторых вариантах осуществления способов лечения рака, описанных в настоящей заявке, рак, который лечат способами, раскрытыми в настоящей заявке, представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления рака, который лечат способами, раскрытыми в настоящей заявке, представляет собой опухоль жидких тканей. В некоторых вариантах осуществления рака, который лечат способами, раскрытыми в настоящей заявке, представляет собой солидную опухоль. В конкретных вариантах осуществления рака, который лечат способами, раскрытыми в настоящей заявке, представляет собой рак молочной железы, колоректальный рак, рак легких, рак головы и шеи, меланому, лимфому или лейкоз. В некоторых вариантах осуществления раковые заболевания включают, но не ограничиваются этим, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, заболевания тяжелых цепей, такие как, например, болезнь альфа-цепи, болезнь гамма-цепи и болезнь мю-цепи, доброкачественную моноклональную гаммопатию и иммуноцитарный амилоидоз, меланомы, рак молочной железы, рак легких, рак бронхов, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак головного мозга или центральной нервной системы, рак периферической нервной системы, рак пищевода, рак шейки матки, рак матки или эндометрия, рак печени, рак почки, тестикулярный рак, рак желчевыводящих путей, рак тонкой кишки или аппендикса, рак слюнной железы, рак щитовидной железы, рак надпочечников, остеосаркому, хондросаркому, рак гематологических тканей и т.п. Другие неограничивающие примеры типов рака, к которым применимы способы, охватываемые настоящим изобретением, включают саркомы и карциномы человека, например, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, рак печени, хориокарциному, соминому, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак кости, опухоль головного мозга, тестикулярный рак, карциному легкого, мелкоклеточную карциному легких, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинелому, гемангиобластому, акустическую неврому, олигодендроглиому, менингиому, меланому, нейробластому, ретинобластому; лейкозы, например, острый лимфоцитарный лейкоз и острый

миелоцитарный лейкоз (миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз); хронический лейкоз (хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз); и истинную полицитемию, лимфому (болезнь Ходжкина и неходжкинскую болезнь), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема и болезнь тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления раковые заболевания имеют эпителиальную природу и включают, но не ограничиваются этим, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, гинекологический рак, рак почки, рак гортани, рак легких, рак полости рта, рак головы и шеи, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак кожи. В других вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы, рак предстательной железы, рак легких или рак толстой кишки. В других вариантах осуществления эпителиальный рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, непапиллярную почечно-клеточную карциному, карциному шейки матки, карциному яичника (например, серозную карциному яичника) или карциному молочной железы. Эпителиальные раковые заболевания могут быть охарактеризованы другими различными способами, в том числе, но не ограничиваясь этим, как серозные, эндометриоидные, муцинозные, светлоклеточные, по типу Бреннера или недифференцированные. В конкретных вариантах осуществления рак, который лечат способами, раскрытыми в настоящей заявке, выбран из перечня, состоящего из мантийноклеточной лимфомы (MCL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Беркитта, множественной меланомы (MM), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого миелоидного лейкоза (AML), малой лимфоцитарной лимфомы (SLL), волосистоклеточного лейкоза (HCL), лимфоплазмоцитарной лимфомы (LPL), лимфомы скелетных мышц (SML), лимфомы маргинальной зоны селезенки (SMZL), лимфомы фолликулярного центра (FCL), колоректального рака, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), рака головы и шеи, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, глиобластомы (GBM), рака предстательной железы, рака пищевода, почечно-клеточной карциномы, карциномы печени, рака мочевого пузыря и карциномы желудка.

[0518] В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предложены способы для лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающие введение эффективного количества описанного в настоящей заявке иммуноконъюгата CpG-Ab нуждающемуся в этом субъекту, при этом иммуноконъюгат CpG-Ab связывается с нектином-4, например иммуноконъюгата CpG-Ab, включающего антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент, и где требующее лечения заболевание или расстройство представляет собой рак, характеризующийся сверхэкспрессией нектина-4. В некоторых вариантах осуществления такие раковые заболевания включают рак пищевода, рак желудка, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, аденокарциному поджелудочной железы, карциному толстой кишки, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак матки, рак почки и рак желчного пузыря. В

некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат CpG-Ab включает последовательность или структуры олигонуклеотидов, перечисленные в одной из Таблиц 2-6.

[0519] В некоторых вариантах осуществления способы лечения включают введение иммуноконъюгата CpG-Ab, который связывается с нектином-4, присутствующим на опухолевой клетке (т.е. иммуноконъюгат CpG-нектин-4-Ab), и лечение приводит к уничтожению или повреждению опухолевой клетки(клеток), так что объем, размер и/или рост опухоли уменьшается или ингибируется. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предложены способы для лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающие введение эффективного количества описанного в настоящей заявке иммуноконъюгата CpG-Ab нуждающемуся в этом субъекту, где иммуноконъюгат CpG-Ab связывается с нектином-4, например иммуноконъюгата CpG-Ab, включающего антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент, и где требующее лечения заболевание или расстройство представляет собой рак, характеризующийся опухолевыми клетками, экспрессирующими нектин-4. В некоторых вариантах осуществления требующее лечения заболевание или расстройство представляет собой рак, при котором опухолевые клетки сверхэкспрессируют нектин-4. В некоторых вариантах осуществления требующее лечения заболевание или расстройство представляет собой рак, при котором опухолевые клетки имеют низкие уровни экспрессии нектин-4. В некоторых вариантах осуществления требующее лечения заболевание или расстройство представляет собой рак, при котором опухолевые клетки имеют умеренные уровни экспрессии нектин-4. В некоторых вариантах осуществления требующее лечения заболевание или расстройство представляет собой рак, при котором опухолевые клетки не реагируют или имеют низкую чувствительность к другой терапии, направленной на нектин-4 (такой как конъюгат антитело к нектину-4 с низкомолекулярным лекарственным средством). В некоторых вариантах осуществления требующее лечения заболевание или расстройство представляет собой рак, при котором опухолевые клетки имеют обнаруживаемый уровень экспрессии нектин-4 от низкого до умеренного. В некоторых вариантах осуществления такие раковые заболевания включают меланому кожи, саркому, рак почки, глиобластому, мезотелиому, тимому, гепатоцеллюлярную карциному печени, феохромоцитому и параганглиому, а также глиому более низкой степени злокачественности.

[0520] В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат способами, раскрытыми в настоящей заявке, резистентен по меньшей мере к одной иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат способами, раскрытыми в настоящей заявке, резистентен по меньшей мере к одному методу лечения рака, выбранному из группы, состоящей из химиотерапии, лучевой терапии, таргетной терапии, вакцинотерапии и CAR-T терапии. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает совместное введение страдающему раком субъекту (i) терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата CpG-нектин-4-Ab; и (ii) иммунотерапевтического средства, к которому рак, лечение которого осуществляют,

показывает резистентность или на которое он не реагирует, когда рак лечат только иммунотерапевтическим средством.

[0521] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящей заявке способы лечения включают введение иммуноконъюгата CpG-Ab, который связывается с нектином-4 (CpG-нектин-4-Ab иммуноконъюгат) в комбинации с одной или несколькими другими терапиями рака. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько других терапий рака могут представлять собой иммунотерапию, противораковую терапию (включая, но не ограничиваясь этим, антитела и/или низкомолекулярные ингибиторы), клеточную терапию, противораковую вакцину и химиотерапию.

[0522] В конкретных вариантах осуществления способы лечения, предложенные в настоящей заявке, включают лечение субъекта, который ранее получал или одновременно получал лечение модулятором иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления модулятор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1. В некоторых вариантах осуществления модулятор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-L1. В частности, в некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления опухоль или опухолевые клетки субъекта, получающего лечение, чувствительны к модулятору иммунных контрольных точек, и лечение иммуноконъюгатом CpG-нектин-4-Ab улучшает реакцию опухоли или опухолевых клеток на лечение. В некоторых случаях улучшение представляет собой уменьшение размера опухоли, роста опухоли или опухолевых клеток и/или уменьшение метастазирования опухолевых клеток.

[0523] В некоторых вариантах осуществления требующий лечения рак реагирует (т.е. поддается лечению) на терапию ингибиторами иммунных контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления рак не реагирует (т.е. является рефрактерным или резистентным к терапии ингибиторами иммунных контрольных точек). В некоторых вариантах осуществления терапия ингибиторами иммунных контрольных точек включает ингибитор PD-1, такой как анти-PD-1 антитело. В некоторых вариантах осуществления терапия ингибиторами иммунных контрольных точек включает ингибитор PD-L1, такой как анти-PD-L1 антитело. В некоторых вариантах осуществления терапия ингибиторами иммунных контрольных точек включает ингибитор CTLA-4, такой как анти-CTLA-4 антитело.

[0524] В конкретных вариантах осуществления опухоль или опухолевые клетки субъекта, получающего лечение, не чувствительны или менее чувствительны к модулятору иммунных контрольных точек (такому как ингибитор), и лечение иммуноконъюгатом CpG-нектин-4-Ab улучшает реакцию опухоли или опухолевых клеток на лечение. В конкретных вариантах осуществления модулятор иммунных контрольных точек представляет собой ингибитор PD-1. В конкретных вариантах осуществления

модулятор иммунных контрольных точек представляет собой ингибитор PD-L1. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает совместное введение страдающему раком субъекту (i) терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата CpG-нектин-4-Ab; и (ii) терапевтически эффективного количества ингибитора PD-1. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает совместное введение страдающему раком субъекту (i) терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата CpG-нектин-4-Ab; и (ii) терапевтически эффективного количества ингибитора PD-L1. В частности, в некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления лечение направлено на субъекта, который не реагирует или устойчив к ингибитору PD-1 или PD-L1, и такого субъекта лечат иммуноконъюгатом CpG-Ab, который связывает нектин-4, таким как иммуноконъюгат CpG-Ab, включающий антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых случаях ответ опухоли или опухолевых клеток на лечение путем совместного введения превышает ответ на любое из отдельных средств при отдельном введении.

[0525] Иллюстративные ингибиторы PD-L1 известны в данной области и включают, без ограничения, атезолизумаб (TECENTRIQ®; Genentech), авелумаб (BAVENCIO®; EMD Serono), дурвалумаб (IMFINZI®; AstraZeneca), KN035, CK-301, AUNP12, CA-170 и BMS-986189. Иллюстративные ингибиторы PD-1 известны в данной области и включают, без ограничения, пембролизумаб (KEYTRUDA®; Merck), ниволумаб (OPDIVO®; Bristol Myers Squibb), цемиплимаб-rwlc (LIBTAYO®; Regeneron/Sanofi), достарлимаб-gxly (JEMPERLI®; GlaxoSmithKline), JTX-4014, спартализумаб (PDR001), камрелизумаб (SHR1210), синтилимаб (IBI308), тислелизумаб (BGB-A317), торипалимаб (JS 001), INCMGA00012, AMP-224 и AMP-514.

[0526] В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий профилактике или лечению с использованием способов, предложенных в настоящем изобретении, представляет собой эпизод рецидива рака у субъекта, который находится в состоянии частичной или полной ремиссии предшествующего рака. В конкретных вариантах осуществления предшествующий рак представляет собой рак жидких тканей (например, рак крови), и рецидивирующий рак, подлежащий профилактике или лечению, представляет собой опухоль жидких тканей. В конкретных вариантах осуществления предшествующий рак представляет собой рак в виде солидной опухоли, и рецидивирующий рак, подлежащий профилактике или лечению, представляет собой солидную опухоль. В конкретных вариантах осуществления предшествующий рак представляет собой рак в виде опухоли жидких тканей, а рецидивирующий рак, подлежащий профилактике или лечению, представляет собой рак в виде солидной опухоли. В конкретных вариантах осуществления предшествующий рак представляет собой рак в виде солидной опухоли, а рецидивирующий рак, подлежащий профилактике



или лечению, представляет собой рак в виде опухоли жидких тканей.

[0527] В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий профилактике или лечению с использованием способов, предложенных в настоящей заявке, представляет собой первый эпизод рецидива рака у субъекта после того, как у субъекта наблюдалась частичная или полная ремиссия. В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий профилактике или лечению с использованием способов, предложенных в настоящей заявке, представляет собой второй эпизод рецидива рака у субъекта после того, как у субъекта наблюдалась частичная или полная ремиссия. В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий профилактике или лечению с использованием способов, предложенных в настоящей заявке, представляет собой третий эпизод рецидива рака у субъекта после того, как у субъекта наблюдалась частичная или полная ремиссия. В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий профилактике или лечению с использованием способов, предложенных в настоящей заявке, представляет собой эпизод рецидива рака, следующий за третьим эпизодом рецидива рака у субъекта после того, как у субъекта наблюдалась частичная или полная ремиссия.

[0528] В некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в настоящей заявке, при введении иммуноконъюгата CpG-нектин-4-Ab CpG-содержащий иммуностимулирующий олигонуклеотид специфически активирует toll-подобный рецептор 9 (TLR9), например, в миелоидной клетке. В некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в настоящей заявке, введение иммуноконъюгата CpG-нектин-4-Ab приводит к одному или более из активации дендритных клеток, активации моноцитов, усиления фагоцитоза опухоли макрофагами и/или повышения секреции цитокинов.

[0529] В некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в настоящей заявке, введение иммуноконъюгата CpG-нектин-4-Ab субъекту активирует иммунные клетки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой Т-клетки и/или НК-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой НК-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой Т-клетки и НК-клетки.

[0530] Также предложены способы активации иммунных клеток у субъекта, включающие введение эффективного количества описанного в настоящей заявке иммуноконъюгата CpG-нектин-4-Ab субъекту. Также предложены применения описанного в настоящей заявке иммуноконъюгата CpG-нектин-4-Ab для получения лекарственного средства для активации иммунных клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой Т-клетки и/или НК-клетки. В некоторых вариантах осуществления активация иммунных клеток у субъекта лечит рак у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из любого из описанных выше раковых заболеваний.

[0531] Не привязывая это к теории, связывание конъюгата антитело к нектину-4-

олигонуклеотид с нектином-4 на опухолевых клетках и обогащение конъюгатами антитело к нектину-4-олигонуклеотид в микроокружении опухоли приводит к индуцированному лигандом связыванию Fc гамма-рецепторов на миелоидных клетках, включая дендритные клетки, запускает кластеризацию Fc с последующей Fc-опосредованной передачей сигналов и интернализацией. После интернализации миграция иммуноглобулинового комплекса в эндосому активирует TLR9, запуская секрецию провоспалительных цитокинов. В дендритных клетках такая интернализация комплексов иммуноглобулина с мишенью может индуцировать процессинг и презентацию опухолевых пептидов. Связывание нектина-4 на опухолевых клетках также может индуцировать фагоцитоз клеток-мишеней, что также может приводить к интернализации конъюгатов антитело к нектину-4-олигонуклеотид, запуская активацию TLR9 в эндосоме. Следовательно, совместное связывание опухолевого антигена и FcγR способствует доставке агониста TLR9 в миелоидные клетки и его активации.

### **ПРИМЕРЫ**

[0533] Раскрытое в настоящей заявке изобретение будет лучше понятно при обращении к следующим примерам, которые представлены в качестве иллюстрации изобретения, а не в качестве ограничения.

### **Материалы**

[0534] Пептиды-прототипы были получены на месте, но их можно приобрести у поставщиков пептидов (например, CPC Scientific). Олигонуклеотиды были получены на месте или произведены компанией LGC. Трансглутаминазу, используемую в этих примерах, выделяли из различных бактериальных штаммов *Streptoverticillium* (например, Ajinomoto). Моноклональные антитела с Q-tag были произведены в Sino Biologicals или собственными силами.

### **Получение олигонуклеотидов**

[0535] Олигонуклеотиды обычно получали в соответствии со схемой твердофазного синтеза, показанной ниже, начиная с первоначального снятия защиты твердофазного носителя для синтеза олигонуклеотида, с последующим связыванием твердофазного носителя с первым нуклеотидом, тиолированием с получением фосфотиозифира и повторным снятием защиты и связыванием с получением полной олигонуклеотидной последовательности.

[0536] Общий синтез олигонуклеотидов, представленных в настоящей заявке, описан ниже.

[0537] *Снятие защиты:* диметокситритил-1,3-пропандиолгликолят-защищенный твердый носитель из стекла с контролируемой пористостью (DMTO-C3-CPG, 1000 Å, объемная плотность 0,26-0,36 г/см<sup>3</sup>, загрузка 30-40 мкмоль/г) подвергали взаимодействию с 3% дихлоруксусной кислотой в толуоле (об/об) при 25°C с получением CPG носителя со снятой защитой. Измеряли УФ-поглощение аликвоты реакционной смеси для определения конечной точки реакции (длина волны 350 нм, целевое минимальное поглощение 0,25 OD, с использованием фиксированной настройки команды наблюдения) и для подтверждения

удаления диметокситритильной защитной группы.

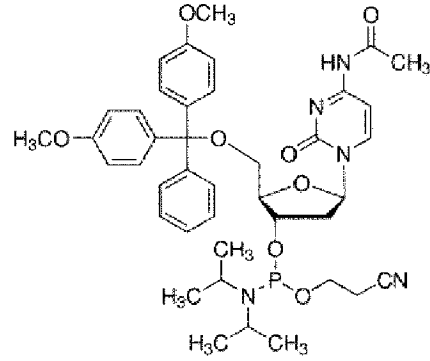
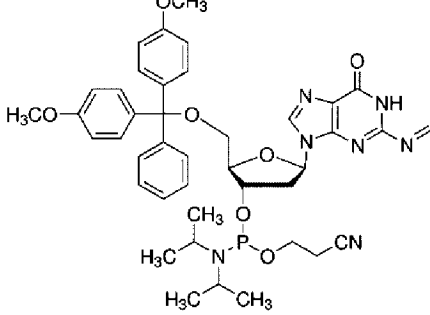
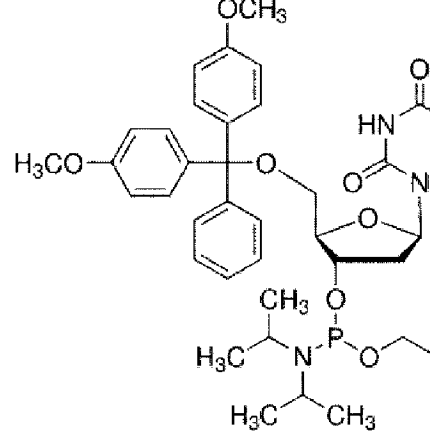
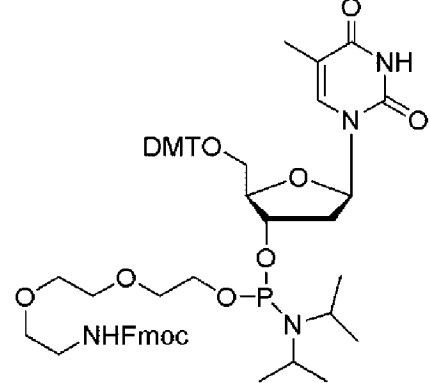
[0538] *Активация/связывание*: носитель CPG со снятой защитой соединяли с фосфорамидитным предшественником первого нуклеотида для 3'-конца, для соответствующего синтезируемого олигонуклеотида, путем добавления и смешивания желаемого 3'-нуклеотида (3 экв.) в течение 5 минут при 25°C в реактор, содержащий носитель CPG со снятой защитой, в присутствии активатора 5-этилтио-1Н-тетразола (0,5 М в ACN) при 60% концентрации нуклеотидов.

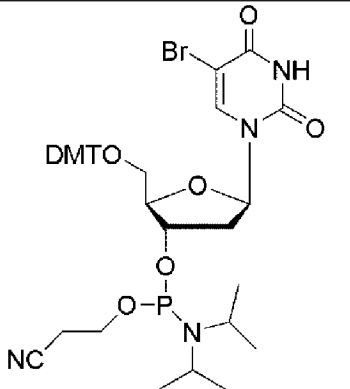
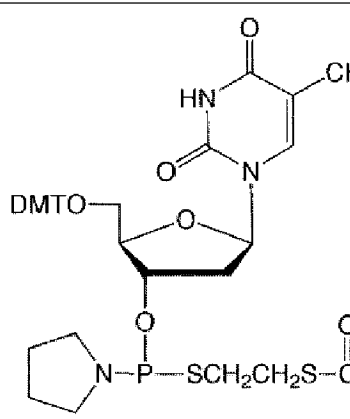
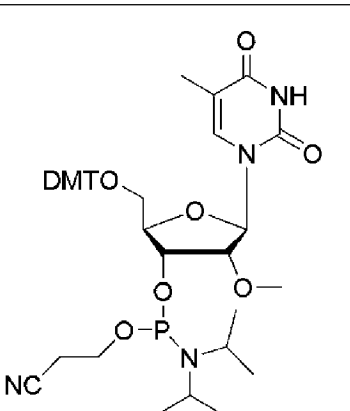
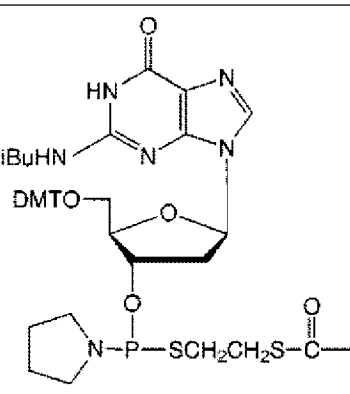
[0539] *Тиолирование/сульфирование*: после стадии связывания фосфит-триэфирную связывающую группу добавленного предшественника нуклеотида тиолировали (или сульфировали) путем добавления Polyorg Sulfa (3-фенил-1,2,4-дитиазолин-5-она), 0,15 М в безводном ACN с получением фосфотиоэфира.

[0540] *Кэпирование*: После сульфирования носитель CPG и связанный нуклеотид обрабатывали двумя кэпирующими композициями (кэпирующая композиция А: 20% N-метилимидазола в ACN; кэпирующая композиция В: 20% уксусного ангидрида, 30% пиридина, 50% ACN) для блокирования непрореагировавших нуклеотидов.

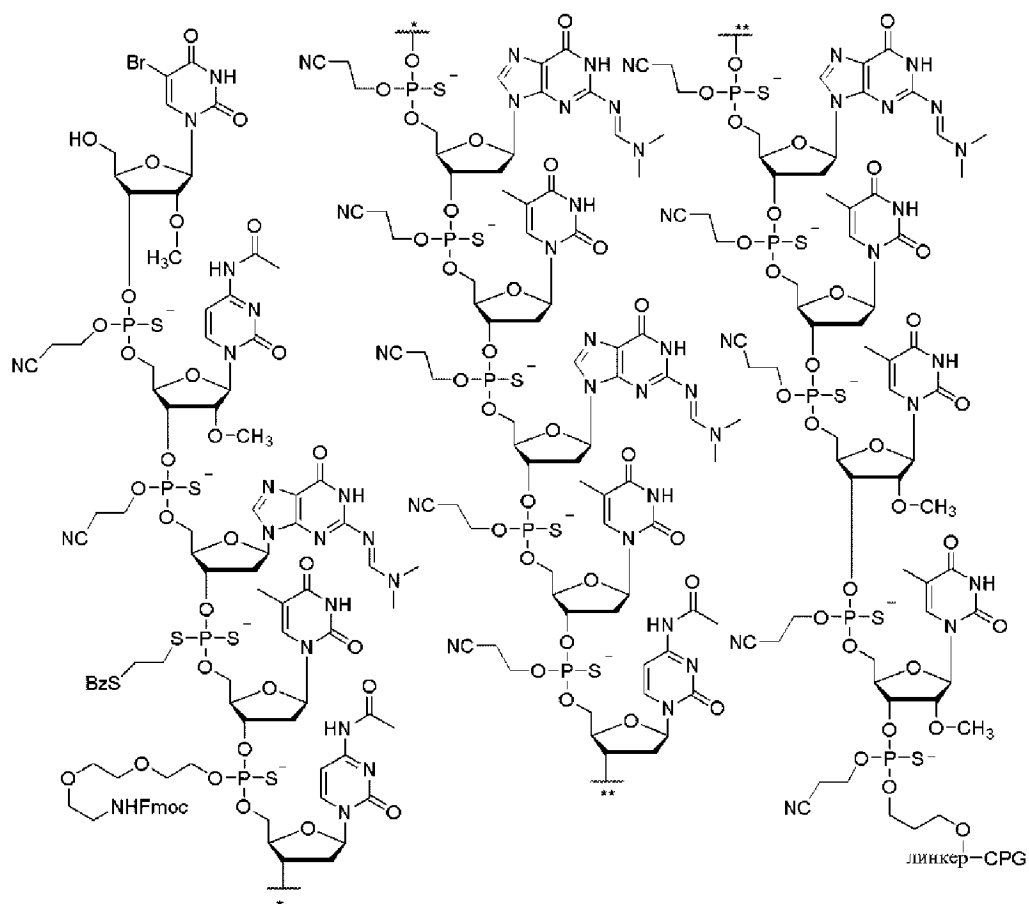
[0541] *Повторный синтез*: остальные нуклеотиды добавляли в последовательность от 3'-конца к 5'-концу с использованием соответствующих фосфорамидитных предшественников в растворе, повторяя стадии снятия защиты, активация/связывания, тиолирования/сульфирования и кэпирования, как описано выше, с получением желаемой олигонуклеотидной последовательности в защищенной форме. Все фосфорамидитные предшественники смешивали с CPG носителем в течение 5 минут на стадии связывания, за исключением dT-тиофосфорамидита, который смешивали в течение 15 минут.

[0542] Выбранные фосфорамидитные предшественники, используемые в синтезе, показаны ниже. Фосфорамидитные предшественники были получены в растворах с использованием растворителей и при концентрациях, которые соответственно показаны, которые следует использовать на стадиях связывания.

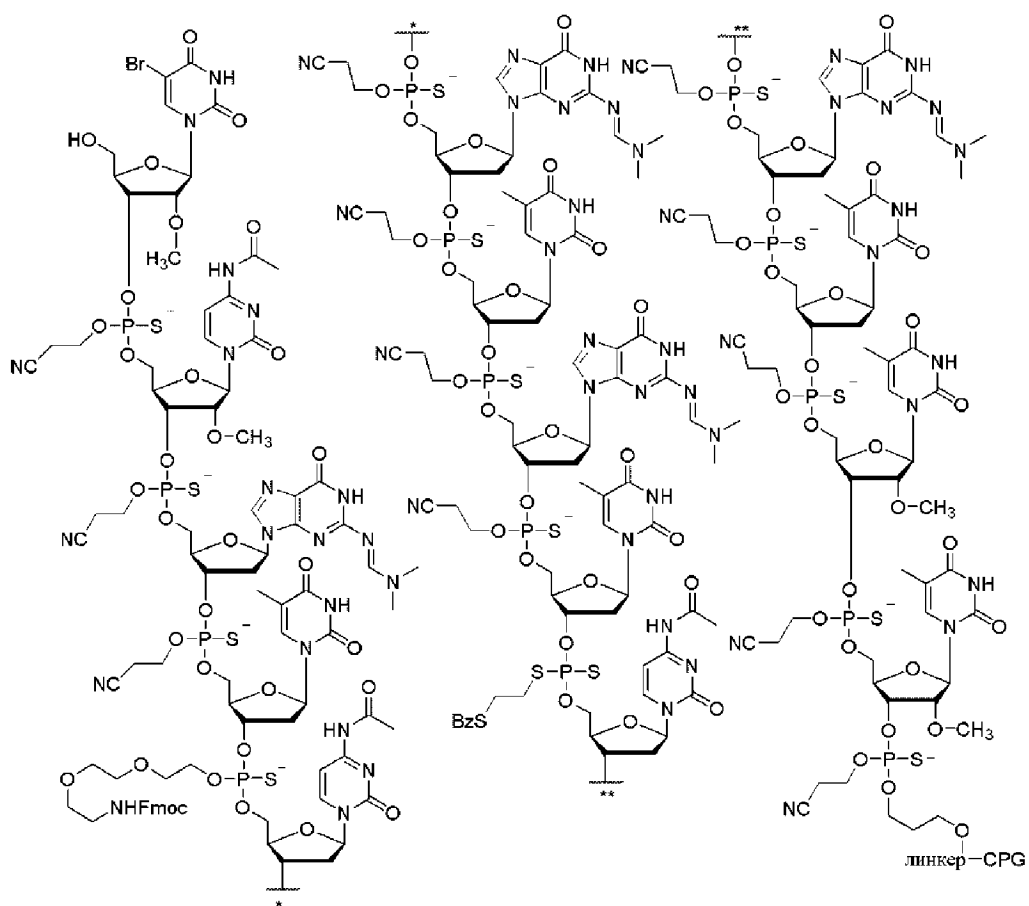
| Амидит                                 | Структура                                                                            | Концентрация          |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| DMT-dC(Ас) Амидит                      |    | 0,1М в безводном АСN: |
| DMT-dG(dmf) Амидит                     |    | 0,1М в безводном АСN: |
| DMT-dT фосфорамидит                    |   | 0,1М в безводном АСN: |
| Fmoc-защищенный DMT-dT PEG2 NH2 Амидит |  | 0,1М в безводном АСN  |

|                                |                                                                                                        |                                       |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 5-Br-dU-CE Фосфорамидит        |                       | 0,1M в безводном ACN                  |
| dT-тиофосфорамидит             |                       | 0,15M в безводном 10% (об/об) DCM/ACN |
| 2'-О-Метил Уридин фосфорамидит | <p>5-Метил CED</p>  | 0,1M в безводном ACN                  |
| dG-тиофосфорамидит             |                     | 0,1M в безводном ACN                  |

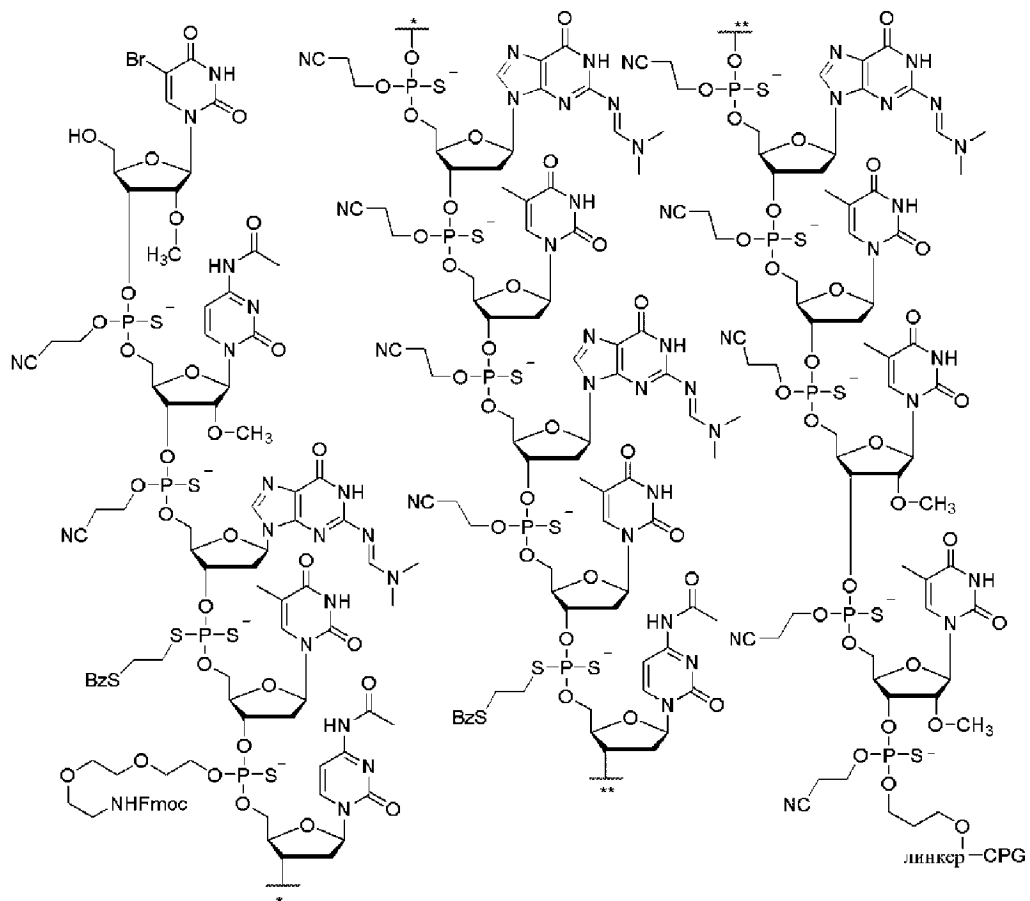
[0543] Иллюстративные Fmoc-защищенные олигонуклеотидные соединения 6.1a, 6.2a и 6.3a, полученные с использованием стадий синтеза, описанных выше, показаны ниже. Снятие защиты, очистка и связывание соединения 6.1a для получения соединения 6.1b описаны ниже.



**Фмос-защищенное соединение 6.1a на CPG носителе**



### Фмос-защищенное соединение 6.2а на CPG носителе



### **Fmoc-защищенное соединение 6.3a на CPG носителе**

[0544] Fmoc-защищенное олигонуклеотидное соединение 6.1a на CPG носителе, полученное в результате синтеза, описанного выше, одновременно отщепляли от носителя и снимали защиту путем взаимодействия CPG-носителя с 20 мМ дитиотреитола в смеси гидроксид аммония:метиламин 1:1 (об/об) в течение 2 часов при комнатной температуре с получением неочищенного соединения 6.1a. Неочищенный продукт очищали ион-парной обращенно-фазовой ВЭЖХ (ИП-ОФ-ВЭЖХ) и его идентичность подтверждали методом ESI-MS. Неочищенное соединение 6.1a очищали методом ВЭЖХ и обессоливали.

[0545] Соединение 6.1a затем подвергали взаимодействию с O-[2-(Fmoc-амино)-этил]-O'-[3-(N-сукцинимидилокси)-3-оксопропил]полиэтиленгликолем (Fmoc-N-амидо-dPEG24)-NHS эфир) в натрийбикарбонатном буфере с получением Fmoc-защищенного соединения 6.1b. Fmoc-защищенное соединение 6.1b подвергали взаимодействию с 20 мМ дитиотреитола в смеси гидроксид аммония:метиламин 1:1 (об./об.) в течение 2 часов при комнатной температуре с получением неочищенного соединения 6.1b. Неочищенный продукт очищали ион-парной обращенно-фазовой ВЭЖХ (ИП-ОФ-ВЭЖХ) и его идентичность подтверждали методом ESI-MS. Неочищенное соединение 6.1b очищали методом ВЭЖХ, обессоливали и лиофилизировали с получением очищенного олигонуклеотида 6.1b.

### **Получение антител**

[0546] Антитела, получаемые собственными силами, обычно экспрессируют в суспензионной культуре, системе Expi293 (ThermoFisher), в соответствии с инструкциями изготовителя. Экспрессированные антитела очищают путем захвата методом хроматографии с белком A MabSelectLX (GE) с элюированием 0,1 М раствором цитрата (pH 3,3) и диализуют в конечной буферной композиции 1X PBS (фосфатно-солевой буферный раствор, pH 7,4). Афукозилированные антитела обычно получают путем коэкспрессии соединения 2-фторфукозы или производных 5-алкинилфукозы в системе Expi293.

### **Одностадийный способ конъюгации посредством mTG (микробной трансглутаминазы)**

[0547] Q-tag с последовательностью RPQGFQPP (SEQ ID NO: 49) был генетически связан с C-концом тяжелой цепи антитела. Для осуществления конъюгации очищенное антитело (содержащее сконструированные Q-tag на C-конце тяжелой цепи) сначала подвергали процедуре буферного обмена в 25ММ Tris, 150ММ NaCl pH 8. Ab-Q-tag-содержащий фрагмент и CpG добавляли при молярном соотношении 1:1,3 и инкубировали в течение ночи с конечной концентрацией 1% mTG (масс/об) (Ajinomoto) при комнатной температуре. Конечная концентрация антитела, используемая для конъюгации, обычно составляет ~ 20-25мкМ. Смесь загружали в колонку с Q Сефарозой HP (GE), уравновешенную 20% Буфера В (40ММ Tris, 2М NaCl pH8) и 80% Буфера А (40ММ Tris, pH8). Колонку промывали 5 колоночными объемами 20% Буфера В. Разделение осуществляли с использованием линейного градиента от 20% В до 60% В, 30



колоночных объемов. DAR1 пиковые фракции (Q-tag, конъюгированный с одним CpG фрагментом) объединяли и концентрировали с последующей стадией гель-фильтрации с использованием S200 (GE). Пиковые фракции мономеров объединяли и концентрировали.

### **Биологическая оценка CpG-нуклеотидов и конъюгатов антитело-CpG нуклеотид**

[0548] Trima-остатки получали от Vitalant и разбавляли 1:4 фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco). Разбавленную кровь разделяли на две пробирки и наслаивали на 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при  $400 \times g$ . PBMC собирали с поверхности раздела и ресуспендировали в буфере FACS (PBS с 0,5% бычьего сывороточного альбумина (Gibco)). В-клетки очищали методом негативной селекции с использованием набора для выделения В-клеток человека, В Cell Isolation Kit II (MilteNY Biotec), и колонок LS (MilteNY Biotec) в соответствии с протоколом изготовителя.

[0549] PBMC сразу же высевали в 96-луночный планшет (500К/луночка) в полную среду RPMI (RPMI+10% FBS). К клеткам добавляли пятикратные серийные разведения от 100 нМ до 6,4 пМ антитела и конъюгированного антитела и 1 мкМ - 64 пМ CpG олигонуклеотидов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 48-96 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение пяти минут при  $400 \times g$  и окрашивали при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки центрифугировали и окрашивали при 4°C в FACS буфере в течение 30 минут, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD19, анти-CD20, анти-CD40, анти-HLADR и анти-CD80 для В-клеточных анализов и анти-CD14, анти-CD3, анти-CD19, анти-CD14, анти-CD123, анти-CD11c и анти-CD86 для pDC анализов. Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. В каждую лунку добавляли микросферы Absolute Counting Beads CountBright™ (Thermo Fisher) для подсчета количества клеток. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения FlowJo 10.7 (Treestar). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции. Сначала исключались линия-специфические клетки (CD19, CD3, CD14) перед гейтированием CD123<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> клеток для определения pDC и гейтированием CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> или CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> клеток для определения В-клеток.

### **Пример 1: Активность свободных иммуномодулирующих олигонуклеотидов (CpG) в человеческих PBMC**

[0550] Человеческие PBMC обрабатывали свободными CpG (SEQ ID NO: 3 и 26-28) для оценки их соответствующей активности, наблюдаемой по экспрессии HLADR и CD40 на CD19-положительных В-клетках (как показано на Фиг. 1А-1В). CpG (SEQ ID NO: 26-28) все показали повышенную активность по сравнению с CpG (SEQ ID NO: 3).

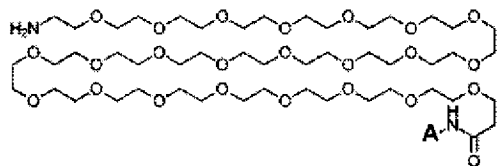
### **Пример 2: Активность иммуномодулирующих олигонуклеотидов**

[0551] Различные CpG олигонуклеотиды, SEQ ID NO: 3-25, испытывали на их

эффекты на пролиферацию и/или активацию В-клеток. Фиг. 2А-2С показывают соответствующую активность отдельных выбранных CpG. Все испытанные CpG олигонуклеотиды усиливали активацию В-клеток через 48 часов инкубации. Как определено путем подсчета микросфер для расчета абсолютного количества В-клеток и экспрессии CD40, все CpG повышали количество В-клеток и экспрессию CD40. Выбранное количество испытанных CpG олигонуклеотидов показало повышенные эффекты на В-клеточную пролиферацию и активацию по сравнению с CpG (SEQ ID NO: 3).

### Пример 3: Трансглутаминаза-опосредованная конъюгация

[0552] Трансглутаминаза-опосредованную конъюгацию испытывали с использованием олигонуклеотида А (с последовательностью: `tucgtcgtgacgtt`, SEQ ID NO: 1), координированного с ПЭГилированным линкером ( $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{PEG}_{23}-\text{NH}_2$ , структура показана ниже), и последовательностей Q-tag пептидов SEQ ID NO: 39-47 и 50-52.



[0553] 2 нмоль Q-tag добавляли к 1 нмоль линкера в присутствии 0,04 нмоль трансглутаминазы в PBS. Конечная концентрация линкера составляла 50 мкМ. Реакции поддерживали при комнатной температуре и гасили раствором 8 М формамида через 1 час. Реакционный раствор анализировали с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ с колонкой Xbridge C18 ( $4,6 \times 150$  мм) с использованием растворителя А (50мМ ТЕАА в воде) и растворителя В (Ацетонитрил) с градиентом от 20% до 60% растворителя В за 10 минут при 60°C. Альтернативно, реакционный раствор анализировали с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ с колонкой Luna 3мкм C18 ( $4,6 \times 50$  мм) с использованием растворителя А (0,1% TFA в воде) и растворителя В (0,1% TFA в ацетонитриле) с градиентом от 10% до 70% растворителя В за 10 минут при 50°C.

[0554] Фиг. 3 показывает выходы трансглутаминаза-опосредованной конъюгации и дезамидирования пептида с использованием различных Q-tag. RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQQF (SEQ ID NO:46), RPRPQQF (SEQ ID NO:50) показали высокий процент конъюгирования и умеренно низкое дезамидирование.

[0555] Фиг. 4А-4В показывают конъюгацию и деконъюгацию двух конъюгатов, полученных из Q-tag с SEQ ID NO: 39 и 47, с течением времени. RPQGF (SEQ ID NO:47) имел более высокий процент конъюгации со всеми испытанными соотношениями Q-tag:линкер+CpG в течение периода 16 ч. Кроме того, скорость деконъюгации RPQGF (SEQ ID NO:47) также была ниже по сравнению с LSLSPGLLQGG (SEQ ID NO:39).

**Пример 4: Оценка активности свободного CpG на экспрессию CD40 CD19<sup>+</sup> В-клетками**

*Материалы и методы*

[0554] Trima-остатки получали от Vitalant и разбавляли 1:2 фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco). Разбавленную кровь разделяли на две пробирки и наслаивали на 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при  $400 \times g$ . PBMC собирали с поверхности раздела и ресуспендировали в буфере FACS (PBS с 0,5% бычьего сывороточного альбумина (Gibco)). После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной среде RPMI (RPMI+10% FBS).

[0557] PBMC сразу же высевали в 96-луночный планшет (500К/луночка) в полной среде RPMI. К клеткам добавляли пятикратные серийные разведения от 1 мкМ до 64 пМ CpG олигонуклеотидов при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение пяти минут при  $400 \times g$  и окрашивали при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки центрифугировали и окрашивали при 4°C в FACS буфере в течение 30 минут, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD19, анти-CD20, анти-CD40, анти-HLADR и анти-CD80. Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (Treestar). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции. В-клетки идентифицировали как CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> клетки, и уровень маркера активации оценивали по средней интенсивности флуоресценции.

[0558] Для анализа Ramos NFkb репортера, клетки Ramos-Blue, NF-kB/AP-1 репортер-содержащие В-лимфоциты, были приобретены у Invivogen. Клетки выращивали и поддерживали в полной DMEM, дополненной 2мМ L-глутамин, 10% FBS, 100мкг/мл нормацина, пенициллином-стрептомицином, 100мкг/мл зеоцина. Осуществляли стимуляцию Ramos-Blue клеток. Клетки быстро промывали в среде роста без антибиотиков. Клетки подсчитывали и ресуспендировали в свежей полной DMEM без выбранных антибиотиков при плотности  $2 \times 10^6$  клеток/мл. 20мкл 10мкМ CpG 7-7 (7-7b; SEQ ID NO:35), CpG 12070 (SEQ ID NO:3) и ODN2006, оттитрованных 1:5, добавляли в плоскодонный 96-луночный планшет, 180мкл клеточной суспензии добавляли до конечной концентрации CpG 1мкМ - 64пМ. Планшет инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> инкубаторе в течение 24ч. В день анализа QB реагент и QB буфер размораживали перед использованием. Раствор Quanti-Blue получали путем добавления 1 мл QB реагента и 1мл QB буфера к 98 мл стерильной воды в стерильной стеклянной бутылки. 180мкл раствора Quanti-Blue добавляли в каждую лунку в новый плоскодонный 96-луночный планшет. 20мкл супернатанта от обработанных клеток Ramos-Blue затем добавляли в 96-луночный планшет. Планшет инкубировали в течение 6ч. Оптическую плотность измеряли при OD655 с использованием планшет-ридера (Molecular Devices) и данные сводили в таблицу в GraphPad Prism 9.0.

### *Результаты*

[0559] Человеческие PBMC обрабатывали свободными CpG для оценки их

соответствующей активности, наблюдаемой по экспрессии CD40 на CD19-положительных В-клетках. Как показано на Фиг. 5, CpG серии 7 (SEQ ID NO: 29, 30 и 32-36) все показали повышенную активность по сравнению с CpG 12070 (SEQ ID NO: 3).

[0560] CpG олиго 7-7, 12070 и ODN2006 (5'-tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt-3'; SEQ ID NO:167) сравнивали в анализе NFκB репортера. Как показано на Фиг. 6, CpG 7-7 показал значительно более высокую активность по сравнению с 12070 и ODN2006.

#### **Пример 5: Оценка активности CpG на PBMC от разных доноров**

[0561] Сравнивали активность CpG олиго 7-6, 7-7 и 12070 в PBMC клетках из трех разных донорных линий (D559, D804 и D643), которую наблюдали по экспрессии CD40. Оценка активности CpG олиго осуществляли с использованием таких же способов, как в Примере 4 выше.

[0562] Результаты показали, что более высокая активность 7-6 и 7-7 по сравнению с 12070 на зависела от донора (Фиг. 7A-7C).

#### **Пример 6: Вклад 5' бром 2' дезоксиуридина и PEG связи в активность CpG**

[0563] Для оценки CpG олигонуклеотидов в человеческих PBMC Trima-остатки получали от Vitalant и разбавляли 1:4 фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco). Разбавленную кровь разделяли на две пробирки и наслаивали на 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при  $400 \times g$ . PBMC собирали с поверхности раздела и ресуспендировали в буфере FACS (PBS с 0,5% бычьего сывороточного альбумина (Gibco)). PBMC сразу же высевали в 96-луночный планшет (500К/луночка) в полную среду RPMI (RPMI+10% FBS). К клеткам добавляли пятикратные серийные разведения от 1 мкМ до 64 пМ CpG олигонуклеотидов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 48-96 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение пяти минут при  $400 \times g$  и окрашивали при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки центрифугировали и окрашивали при 4°C в течение 30 минут в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD19, анти-CD40 и анти-CD86. Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (Treestar). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции. Осуществляли гейтирование CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> или CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> клеток для определения В-клеток. Данные сводили в таблицу с использованием GraphPad Prism 9.0.

[0564] Как показано на Фиг. 8, CpG олигонуклеотиды 9-9 и 9-10 без бром-модификации на 5' урдине активировали экспрессию CD86. Из этого следует, что бром-модификация не является существенным компонентом соответствующих олигонуклеотидов.

#### **Пример 7: Получение антител против нектина-4**

[0565] Для скрининга антител против нектина-4 человека использовали запатентованную библиотеку фагов наивных В-клеток человека. Методы, использованные

для создания библиотеки наивных фагов человека, были такими, как описано в Clackson et al., Nature 1991, 352, 624-628 или Marks et al., J. Mol. Biol., 1991, 222:581-597. Для этой программы обнаружения человеческих антител к нектину-4 использовали белок hNectin4-ECD-His-Avi AcroBiosystems (номер по каталогу: NE4-H52H3) и белковую конструкцию hNectin4 ECD-6His-Avi (TNT174; см. Таблицу 19) для завершения 5 раундов пэннинга фагов. Конечные обогащенные объединенные фаговые клоны высевали для получения отдельных клонов. Амплифицированные фаговые частицы подвергали скринингу с использованием ELISA и лучшие клоны секвенировали и анализировали.

[0566] ELISA планшеты IMMULON™ (THERMO SCIENTIFIC™; номер по каталогу 3855) инкубировали в течение ночи при комнатной температуре с 50 мкл/лунка либо 2мкг/мл внеклеточного домена нектин-4 человека (ECD) (Acrobiosystems; номер по каталогу NE4-H52H3) в фосфатно-солевом буферном растворе pH 7,4, либо с 10% бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBS, промывали TBST (25мМ Tris, 0,15М NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,5) и блокировали 300мкл/лунка раствором 2% BSA в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали TBST и 50мкл/лунка свежеполученных культур фаговых клонов, разведенных 1:100 в 2% BSA, в PBS+0,01% Tween-20 добавляли в лунки, покрытые нектином-4 человека, и в лунки, покрытые 10% BSA, и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали TBST перед 1-часовой инкубацией 100мкл/лунка, 0,5 мкг/мл, антитела против g8p белка оболочки фага M13, разведенного в 2% BSA в PBS+0,01% Tween-20. После промывки буфером TBST в лунки добавляли, 100мкл/лунка, 0,5мкг/мл HRP-конъюгированного козьего антимышиного IgG в 2% BSA в PBS+0,01% Tween-20 и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Лунки промывали TBST и в планшеты добавляли, 100мкл/лунка, 3,3',5,5'-тетра-метилбензидинового субстрата пероксидазы приблизительно в течение 2-5 минут. Реакцию останавливали добавлением, 100мкл/лунка, 0,16М серной кислоты и полученную оптическую плотность (O.D.) измеряли при 450нм с контрольной длиной волны 570нм, используя планшет-ридер.

[0567] Клоны разделяли по четырем титрам на основании O.D. покрытых нектином-4 человека лунок, деленной на O.D. BSA-покрытых лунок. Титры были >10-кратными (38 из 176 клонов), >5-10-кратными (43 из 176 клонов), 2-5-кратными (62 из 176 клонов), и менее чем 2-кратными (33 из 176 клонов).

[0568] Секвенирование осуществляли на 38 клонах с >10-кратным титром. После анализов последовательностей было отобрано 11 клонов. Полноразмерные рекомбинантные моноклональные антитела получали с использованием выбранных переменных доменов в виде мышинных IgG2a антител. Экспрессию антител осуществляли в суспензионной культуре НЕК293 и очищали хроматографией на основе связывания с белком А с элюированием раствором 0,1М цитрата (pH 3,3), а затем диализовали в конечной буферной композиции 1× PBS. Последовательности VL и VH для антител (индивидуально обозначенных как TNT-188, TNT-189, TNT-190, TNT-191, TNT-192, TNT-193, TNT-194, TNT-195, TNT-196, TNT-197 и TNT-198 для мышинных IgG2a

конструкций) представлены в Таблице 7 (VH-домены) и Таблице 8 (VL-домены). Также была получена последовательность описанного антитела к нектину-4 и обозначена как TNT-153 (последовательности VH и VL также в Таблицах 7 и 8). Последовательности легких цепей и тяжелых цепей мышиных IgG2a представлены в Таблицах 12 и 13, соответственно.

[0569] Соответствующие антитела также были сконструированы как полноразмерные антитела с человеческим IgG1. Человеческие IgG1 антитела были обозначены как TNT-201, TNT-202, TNT-203, TNT-204, TNT-205, TNT-206, TNT-207, TNT-208, TNT-209, TNT-210, TNT-211 и TNT-212. VH и VL домены представлены в Таблице 7 и Таблице 8, соответственно. Последовательности легких цепей и тяжелых цепей представлены в Таблицах 14 и 15, соответственно.

[0570] Определения CDR в соответствии с Chothia, Kabat и IMGT представлены в Таблицах 9, 10 и 11, соответственно, для каждого из этих антител.

#### **Пример 8: Характеристика антител к нектину-4.**

[0571] **Первоначальное тестирование связывания антител к нектину-4 с нектином-4.** Связывание антител к нектину-4, описанных в предыдущем примере для мышиного IgG2a, с ECD нектина-4 человека (TNT-175) оценивали методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием Bio-Rad ProteOn™. Биотинилированный белок А (15 мкг/мл) иммобилизовали на поверхности чипа NLC. 30 нМ очищенного супернатанта моноклонального антитела разводили в PBS-T и захватывали на поверхности белка А. Серийные разведения человеческого нектина-4 инжескировали поверх чипов, покрытых моноклональными антителами, и определяли кинетику связывания. Чипы регенерировали с использованием 4:1 об/об масла для элюирования IgG/4 М NaCl. Данные связывания представлены в Таблице 18 ниже.

**Таблица 18**

#### **Связывание с нектином-4 человека**

| Антитело | Ka (1/Мс) | Kd (1/с) | KD (М)   |
|----------|-----------|----------|----------|
| TNT-188  | 2,17E+05  | 1,53E-03 | 7,03E-09 |
| TNT-189  | 8,32E+05  | 4,23E-03 | 5,09E-09 |
| TNT-190  | 2,65E+05  | 8,31E-03 | 3,14E-08 |
| TNT-191  | 2,29E+05  | 9,83E-04 | 4,30E-09 |
| TNT-192  | 3,22E+05  | 2,94E-03 | 9,14E-09 |
| TNT-193  | 2,24E+06  | 8,37E-03 | 3,73E-09 |
| TNT-194  | 3,92E+06  | 2,30E-03 | 5,85E-10 |
| TNT-195  | 9,30E+05  | 1,25E-03 | 1,34E-09 |
| TNT-196  | 1,62E+06  | 2,45E-02 | 1,52E-08 |
| TNT-197  | 7,80E+05  | 3,34E-03 | 4,28E-09 |
| TNT-198  | 6,84E+04  | 1,38E-03 | 2,02E-08 |

|         |          |          |          |
|---------|----------|----------|----------|
| TNT-153 | 1,05E+06 | 3,99E-03 | 3,80E-09 |
|---------|----------|----------|----------|

[0572] Все антитела к нектину-4 связывались с нектином-4 человека в диапазоне от 30 нМ до 0,5 нМ.

[0573] **Дополнительное тестирование связывания отобранных антител к нектину-4 с нектином-4 человека, мыши и обезьяны (супо).** Дополнительную оценку антител к нектину-4 осуществляли путем измерения связывания с нектином-4 человека, мыши и обезьяны *супомolgus*. Чтобы дополнительно охарактеризовать связывание четырех моноклональных антител к нектину-4 использовали Biacore 8K (Cytiva, Marlborough, MA). Сравнивали их аффинность связывания с конструкцией человеческого нектин-4-ECD (TNT-175), мышиногo нектин-4-ECD (TNT-250), человеческого нектин-4-IgV (TNT-252) домена и конструкцией супо-нектин-4-ECD (TNT-255) белка (конструкции см. в Таблице 19).

Таблица 19

## Белковые конструкции

| Конструкция                                  | Последовательность                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Человеческий нектин-4 ECD-6His-Avi (TNT-174) | GELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAWARV<br>DAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVEQPPPRNPLDGS<br>VLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLPPLPS<br>LNPGPALEE<br>GQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTTSSRSFKHSRSA<br>AVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSF<br>LAEASVRGLEDQNLWHIGREGAMKCLSEGQPPPSYNWTR<br>LDGPLPS<br>GVRVDGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVDV<br>LDPQEDSGKQVDLVSASHHHHHHGLNDIFEAQKIEWHE<br>(SEQ ID NO:488) |
| Человеческий нектин-4 ECD-6His (TNT-175)     | GELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAWARV<br>DAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVEQPPPRNPLDGS<br>VLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLPPLPS<br>LNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTTSS<br>RSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQ<br>RITHILHVSFLAEASVRGLEDQNLWHIGREGAMKCLSEGQ<br>PPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGFPLTTEHSGIYVCH<br>VSNEFSSRDSQVTVDVLDQPEDSGKQVDLVSASHHHHHH<br>(SEQ ID NO:489)                        |
| Мышиный нектин-4                             | GELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDEQVGQVAWARV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

|                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ECD-6His (TNT-250)                         | <p>DP</p> <p>NEGIRELALLHSKYGLHVNPAYEDRVEQPPPPRDPLDGSVL<br/>         LRNAVQADEGEYECRVSTF<br/>         PAGSFQARMRLRVLPPLPSLNPGPPLLEEGQGLTLAASCTAE<br/>         GSPAPSVTWDTEVKGTQS<br/>         SRSFTHPRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQD<br/>         RRITHTLQVAFLAEASVRG<br/>         LEDQNLWQVGREGATLKCLSEGQPPPKYNWTRLDGPLPSG<br/>         VRVKGDTLGFPLTTEHSGV<br/>         YVCHVSNELSSRDSQVTVEVLDPEDPGKQVDLVSASHHHH<br/>         HH (SEQ ID NO:490)</p>                                                                |
| Мышиный нектин-4<br>ECD-6his-Avi (TNT-176) | <p>GELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDEQVGQVAWARV</p> <p>DP</p> <p>NEGIRELALLHSKYGLHVNPAYEDRVEQPPPPRDPLDGSVL<br/>         LRNAVQADEGEYECRVSTF<br/>         PAGSFQARMRLRVLPPLPSLNPGPPLLEEGQGLTLAASCTAE<br/>         GSPAPSVTWDTEVKGTQS<br/>         SRSFTHPRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQD<br/>         RRITHTLQVAFLAEASVRG<br/>         LEDQNLWQVGREGATLKCLSEGQPPPKYNWTRLDGPLPSG<br/>         VRVKGDTLGFPLTTEHSGV<br/>         YVCHVSNELSSRDSQVTVEVLDPEDPGKQVDLVSASHHHH<br/>         HH GLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO:501)</p> |
| Человеческий нектин-4-IgV-6His (TNT-252)   | <p>GELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAWARV</p> <p>DAGEGAQELALLHSKYGLHVS</p> <p>PAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTF<br/>         PAGSFQARLRLRVLVHHHH<br/>         HH (SEQ ID NO:491)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Человеческий нектин-1 ECD-6His (TNT-260)   | <p>QVVQVNDSMYGFITDVLHCSFANPLPSVKITQVTWQKS</p> <p>TNGSKQNVAIYNPSMGVSVL</p> <p>APYRERVEFLRPSFTDGTIRLSRLELEDEGVYICEFATFPTGN<br/>         RESQLNLTVMKPTNWI<br/>         EGTQAVLRAKKGQDDKVLVATCTSANGKPPSVVSWETRLK<br/>         GEAEYQEIRNPNGTVTVISR<br/>         YRLVPSREAHQQSLACIVNYHMDRFKESLTLNVQYEPEVTI</p>                                                                                                                                                                                                               |



|                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                      | EGFDGNWYLQRMDVKLTCK<br>ADANPPATEYHWTTLNGLSLPKGVEAQNRTLFFKGPINYSLA<br>GTYICEATNPIGTRSGQVE<br>VNITEFPYTPSPPEHGRRAGPVPTAIIHHHHHHH (SEQ ID<br>NO:492)                                                                                                                                                                                                                                          |
| Суно нектин-4 ECD-<br>6His (TNT-255) | GELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAWARA<br>DAGEGAQELALLHSKYGLHVS<br>PAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTF<br>PAGSFQARLRLRVLPPLP<br>SLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTDTEVKGTTS<br>SRSFKHSRSAAVTSEFHLV<br>PSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVRGL<br>EDQNLWHVVGREGAMLKCL<br>SEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGFPLTTEHSGIY<br>VCHVSNEFSSRDSQVTVD<br>VLDPQEDSGKQVDLVSASHHHHHH (SEQ ID NO:493) |

[0574] Все эксперименты осуществляли при температуре 25°C и в буфере HBS-EP+ (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% Tween-20). Антитела захватывали или иммобилизовали на чипе Biacore либо методом связывания амина на CM5, либо захватывали на чипе с белком А, либо захватывали антимышиным поликлональным антителом или античеловеческим поликлональным антителом. Одноцикловую или многоцикловую кинетику определяли с использованием 3-кратного или 5-кратного серийного разведения антигенных белков от 1 до 900 нМ, в зависимости от аффинности. Данные были обработаны и проанализированы в программном обеспечении Biacore Insight Evaluation Software с использованием вычитания двух опорных сигналов данных, а затем сопоставлены с простой моделью связывания Ленгмюра с использованием глобальных кинетических констант скоростей для ассоциации ( $K_a$ ), диссоциации ( $K_d$ ) и значений  $R_{max}$  на образец. Качество подгонки определяли путем проверки остатков и статистических  $T$  значений, а равновесную константу диссоциации (или аффинность) определяли по отношению кинетических констант скорости  $K_D=K_d/K_a$ .

[0575] По сравнению с TNT-212, описанным антителом к нектину-4, TNT-207 и TNT-208 связываются с более высокой аффинностью к ECD нектин-4 человека, нектин-4-IgV человека и ECD нектин-4 суно. TNT-210 имеет сопоставимую с TNT-212 аффинность связывания как в отношении ECD нектин-4 человека, так и ECD нектин-4 суно. TNT-203, TNT-207, TNT-208 и TNT-210 также связывались ECD нектин-4 мыши с разной аффинностью от 115 нМ до 6 нМ. Высококачественные кинетические данные связывания TNT-212 с ECD нектин-4 мыши не были получены в существующем формате

анализа. Результаты анализа связывания представлены в Таблице 20, ниже.

Таблица 20

**Связывание антител с белками нектин-4**

| Антитело | ECD нектин-4 человека (K <sub>D</sub> ; нМ) | ECD нектин-4 мыши (K <sub>D</sub> ; нМ) | Нектин-4-IgV человека (K <sub>D</sub> ; нМ) | ECD нектин-4 супо (K <sub>D</sub> ; нМ) |
|----------|---------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------|
| TNT-203  | 70                                          | 115                                     | 138                                         | 172                                     |
| TNT-207  | 1.5                                         | 6                                       | 1.8                                         | 4.2                                     |
| TNT-208  | 5                                           | 21                                      | 5.4                                         | 12                                      |
| TNT-210  | 12                                          | 12                                      | 17                                          | 36                                      |
| TNT-212  | 8                                           | -                                       | 10                                          | 40                                      |

[0576] Четыре антитела к нектину-4 из Таблицы 20 (TNT-203, TNT-207, TNT-208 и TNT-210) были конъюгированы с CpG 7-7 (7-7b; SEQ ID NO:35), и конъюгаты связывались с антигеном ECD нектин-4 человека с таким же значением K<sub>D</sub>, как и неконъюгированные антитела (данные не показаны). Это указывает на то, что конъюгация CpG олигонуклеотидов с антителами к нектину-4 не нарушает связывание антител к нектину-4 с нектином-4.

[0577] **Связывание антител к нектину-4 с клетками.** Также оценивали клеточное связывание антител к нектину-4. Клетки MNK74 (нектин-4-положительные) и AGS (нектин-4-отрицательные) получали из ATCC и культивировали в соответствии с их протоколами. Клетки отделяли при помощи TrypLE (Gibco) и промывали при центрифугировании в течение пяти минут при 400 × g с использованием FACS буфера (PBS+2% FBS). Клетки ресуспендировали в FACS буфере, высевали в 96-луночный планшет (0,25e6/луночка), затем осаждали центрифугированием в течение пяти минут при 400 × g. Клетки окрашивали при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 506 (eBioscience), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки центрифугировали и окрашивали при 4°C в FACS буфере в течение 30 минут, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), и с каждым из антител (TNT-188, TNT-189, TNT-190, TNT-191, TNT-192, TNT-193, TNT-194, TNT-195, TNT-196, TNT-197, TNT-198 или TNT-153). Клетки центрифугировали, промывали один раз в FACS буфере и окрашивали при 4°C козьим F(ab')<sub>2</sub> антимышиным IgG APC (Southern Biotech), разведенным 1:400 в FACS буфере, в течение 30 минут или соответствующим анти-человеческим IgG. Клетки центрифугировали, промывали два раза и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher) с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (BD). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 506-отрицательной популяции. Уровни экспрессии нектин-4 подтверждали с использованием положительного контроля мышинового антитела против нектин-4 человека AF488 (R&D

Systems). Связывание оценивали по средней интенсивности флуоресценции.

[0578] Все испытанные антитела к нектину-4 (TNT-188 - TNT-198 и TNT-153) специфически связывались с MNK74 клетками, экспрессирующими нектин-4 человека, и не связывались с AGS клетками, которые не экспрессируют нектин-4 человека. Результаты представлены в таблице ниже.

**Таблица 21**

**Связывание антител с нектин-4-положительными клетками**

| Антитело | Кратное изменение связывания с MNK74 по сравнению с контрольным AGS |
|----------|---------------------------------------------------------------------|
| TNT-188  | 4,3                                                                 |
| TNT-189  | 5                                                                   |
| TNT-190  | 5,1                                                                 |
| TNT-191  | 5                                                                   |
| TNT-192  | 4,5                                                                 |
| TNT-193  | 5,2                                                                 |
| TNT-194  | 7                                                                   |
| TNT-195  | 6,4                                                                 |
| TNT-196  | 6                                                                   |
| TNT-197  | 4,8                                                                 |
| TNT-198  | 5,9                                                                 |
| TNT-153  | 7,4                                                                 |

[0579] **Конкурентные анализы антител к нектину-4.** ELISA планшеты покрывали в течение ночи при 4°C козым антимышиным IgG при 1мг/мл в PBS. Планшеты промывали промывочным буфером для ELISA 3X 300мкл (25мМ Tris, 150мМ NaCl, 0,05% Tween20), затем инкубировали с 1мг/мл захватывающего антитела (TNT-153 и TNT-188 - TNT-198, антитела к нектину-4 в виде мышинового IgG2a) в течение часа при комнатной температуре. Одновременно с этим заранее приготовленную смесь (премикс) каждого антитела (TNT-201-TNT212, антитела к нектину-4 в виде человеческого IgG1) при 2мг/мл инкубировали в течение часа при комнатной температуре в разбавителе (PBS с 0,5% BSA) с разведениями нектин-4-ECD-6His-Avi (TNT-175) при молярном соотношении TNT-175 с каждым антителом от 2:1 до 0,031:1. В качестве положительного контроля нектин-4 разводили в тех же концентрациях без антитела из премикса. Две лунки на планшет были выделены для использования только разбавителя в качестве отрицательного/фонового контроля. Планшеты промывали, как и ранее, в каждый планшет добавляли 50 мкл премикса на лунку и инкубировали в течение одного часа. Планшеты промывали, затем инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа с Rabbit anti 6X HIS HRP, разведенным 1:4000 в разбавителе. Планшеты промывали

еще раз и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут с 50 мкл/лунка субстрата ABTS. Планшеты считывали при 405 нм, данные экспортировали и анализировали в Excel. Связывание измеряли как значение оптической плотности (O.D.), нормализованное к фону и рассчитанное как процент от положительного контроля при наименьшем разведении нектин-4 для наибольшего разрешения. 100% указывает на способность связывать комплекс антитело-нектин-4, что указывает на неблокирующее антитело, тогда как 0% указывает на отсутствие связывания, что указывает на блокирующее антитело.

[0580] Все антитела ингибировали способность друг друга связывать нектин-4 человека. Степень блокирования хорошо коррелировала со скоростью диссоциации ( $K_d$  1/с) и общей аффинностью каждого антитела. Имеющие более высокую скорость диссоциации, такие как TNT-205, с трудом могли полностью блокировать самих себя. В формате премикса эти антитела могут отталкиваться захватывающими антителами с более высокой аффинностью. При оценке связывания в обеих ориентациях захвата и премикса ни одно из антител к нектину-4 не способно образовывать сэндвич, и поэтому все они могут быть охарактеризованы как блокаторы друг друга. Результаты представлены на Фиг. 10.

#### **Пример 9: Интернализация антител к нектину-4.**

[0581] Антитела TNT201-TNT212 метили AlexaFluor-647 с использованием набора для мечения белков (Invitrogen) в соответствии с протоколом изготовителя. Вкратце, 100-150 мкг антитела в натрий-бикарбонатном буфере (pH 8,3) инкубировали с реактивными красящими реагентами при осторожном перемешивании и комнатной температуре в течение 1 часа. Невключившиеся красители удаляли методом эксклюзионной хроматографии с использованием очищающих смол и колонок, входящих в наборы. Клетки T47D, экспрессирующие нектин-4 человека, получали из ATCC и культивировали в соответствии с их рекомендациями. Клетки отделяли при помощи TrypLE (Gibco) и промывали при центрифугировании в течение пяти минут при  $400 \times g$  буфером FACS (PBS с 1% BSA). Клетки ресуспендировали в буфере FACS и распределяли аликвотами в 11 пробирок, одну на каждый образец по 1 мл каждой, всего 2 миллиона клеток на пробирку. Каждую пробирку окрашивали 10 мкг меченого TNT антитела в течение 60 минут при 4°C. Клетки дважды промывали буфером FACS и ресуспендировали в 1 мл буфера FACS на образец. Клетки хранили на льду в темноте до тех пор, пока 100-мкл аликвоту на пробирку для образца не переносили в инкубатор в условия 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в момент времени -3 часа, -2 часа, -1 час, -45 минут, -30 минут, -15 минут, -10 минут, -5 минут для интернализации таким образом, чтобы все временные точки были завершены одновременно. После удаления из инкубатора клетки промывали буфером FACS, затем ресуспендировали в 100 мкл папаина (папаин из латекса папайи, Sigma) при 23,9 Ед/мл, разведенного в PBS (Gibco), и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Затем клетки промывали и окрашивали в течение 30 минут при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 506 (eBioscience), разведенном 1:2000 в PBS (Gibco). Клетки еще раз промывали

буфером FACS и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher) с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (BD). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 506-отрицательн популяци. Образцы оценивали по средней интенсивности флуоресценции для каждого момента времени. Образец при 4°C в момент времени 0 минут использовался в качестве контроля «отсутствие интернализации» и, таким образом, считался имеющим 100% антитела-AlexaFluor-647, локализованного на клеточной поверхности. Таким образом, интернализованное антитело-AlexaFluor-647 рассчитывали как разницу между локализованным на поверхности антителом при 4°C и антителом при 37°C и выражали как процент относительно значения образца при 4°C.

[0582] Все TNT антитела демонстрировали интернализацию, за исключением TNT203, который показал от незначительной до полного отсутствия интернализации. Самый высокий уровень интернализации наблюдался у TNT207, TNT210, TNT208 и TNT202. TNT207, по-видимому, демонстрирует более высокую степень интернализации, чем TNT212. Результаты представлены в Таблице 22 ниже и на Фиг. 15.

Таблица 22

#### Интернализация антител к нектину-4

| Антитело | % интернализованного антитела (через 3 часа) |
|----------|----------------------------------------------|
| TNT-201  | 14,5%                                        |
| TNT-202  | 23,0%                                        |
| TNT-203  | 1,5%                                         |
| TNT-204  | 14,3%                                        |
| TNT-205  | 15,0%                                        |
| TNT-207  | 37,8%                                        |
| TNT-208  | 18,4%                                        |
| TNT-209  | 15,3%                                        |
| TNT-210  | 21,1%                                        |
| TNT-211  | 9,5%                                         |
| TNT-212  | 31,1%                                        |

#### Пример 10: Конъюгация антител к нектину-4 с CpG олигонуклеотидами.

[0583] Конъюгационная метка с последовательностью RPQGF<sub>3</sub>GPP (SEQ ID NO:49) была сконструирована на С-конце всех экспрессирующихся конструкций тяжелой цепи рекомбинантного моноклонального антитела. Это позволило конъюгировать CpG олигонуклеотид с С-концом антитела. Все конструкции ДНК были кодон-оптимизированы и синтезированы компанией ATUM (Menlo Park, CA, USA). Все антитела транзientно экспрессировали в системе экспрессии Expi293 (Life Technology, USA). Для конъюгации с CpG олигонуклеотидами в реакцию конъюгации добавляли антитело к нектину-4, очищенное аффинной хроматографией на белке А, при 5-20 мкМ, инкубировали с 1-10

мкг микробной трансглутаминазы, при соответствующем молярном отношении CpG олигонуклеотидов к mAb, в течение ночи при комнатной температуре. Соответствующие DAR пиковые фракции, полученные в результате анионообменной хроматографии, дополнительно очищали методом эксклюзионной хроматографией или другими методами очистки, если это необходимо. Конечные антитела и их конъюгаты с CpG использовали для анализов *in vitro* и *in vivo* в 1X PBS, pH 7,4. Каждое из антител TNT-201 - TNT-212 в человеческом IgG1 с Q-tag (т.е. легкая цепь и тяжелая цепь, раскрытые в таблицах 14 и 15, соответственно) были получены и конъюгированы с соответствующими CpG олигонуклеотидами. Перечень анти-нектин-4 конъюгатов и их обозначения приведены в таблице 23. TNT-347xx представляет собой антитело TNT-337, конъюгированное с агонистом TLR8. TNT-381xx представляет собой антитело TNT-212, конъюгированное с MMAE.

Таблица 23

## Перечень анти-нектин-4 конъюгатов

| Обозначение конъюгата | Антитело, используемое для конъюгации |
|-----------------------|---------------------------------------|
| TNT-169a              | TNT-154*                              |
| TNT-354a              | TNT-201*                              |
| TNT-264a              | TNT-203*                              |
| TNT-364a              | TNT-204*                              |
| TNT-265a              | TNT-207*                              |
| TNT-266a              | TNT-208*                              |
| TNT-267a              | TNT-210*                              |
| TNT-357a              | TNT-211*                              |
| TNT-358a/TNT-169a     | TNT-212*                              |
| TNT-359a              | TNT-317*                              |
| TNT-360a              | TNT-321*                              |
| TNT-361a              | TNT-323*                              |
| TNT-365a              | TNT-324*                              |
| TNT-349a              | TNT-327*                              |
| TNT-350a              | TNT-328*                              |
| TNT-362a              | TNT-332*                              |
| TNT-351a              | TNT-333*                              |
| TNT-352a              | TNT-335*                              |
| TNT-363a              | TNT-208 нефукозилированное*           |
| TNT-348a              | TNT-208**                             |
| TNT-373a              | TNT-327**                             |

|          |                             |
|----------|-----------------------------|
| TNT-374a | TNT-328**                   |
| TNT-375a | TNT-333**                   |
| TNT-302a | TNT-194**                   |
| TNT-303a | TNT-195**                   |
| TNT-304a | TNT-197**                   |
| TNT-273a | TNT-153**                   |
| TNT-372a | TNT-201**                   |
| TNT-377b | TNT-201***                  |
| TNT-385a | TNT-201* нефукозилированное |
| TNT-415a | TNT-412*                    |
| TNT-416a | TNT-414*                    |

\*конъюгация с CpG 7-7 (SEQ ID NO:35) как DAR1

\*\*конъюгация с CpG 4523 (SEQ ID NO:499) как DAR1

\*\*\*конъюгация с CpG 4523 (SEQ ID NO:499) как DAR2

#### **Пример 11: Активация моноцитов конъюгатами антител к нектину-4-CpG.**

[0584] Trima-остатки получали от Vitalant и разбавляли PBS 1:2. Разбавленную кровь наслаивали в пробирке на 15мл Ficoll-Paque. Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при  $400 \times g$ . PBMC собирали на границе раздела, ресуспендировали и промывали в FACS буфере (PBS с 0,5% BSA). После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной RPMI1640 (RPMI1640+10% FBS). PBMC сразу же высевали в 96-луночный планшет (0,5еб/лунка) в полной RPMI. Опухолевые клетки (0,025Еб/лунка) из исходной линии клеток DLD-1, меченных CellTrace CFSE (ThermoFisher), или DLD-1, трансдуцированных для сверхэкспрессии нектин-4 и GFP, добавляли к PBMC при 20:1 (эффектор:мишень). К клеткам добавляли трехкратные серийные разведения от 300 нМ до 0,41 нМ конъюгатов антител к нектину-4-CpG при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 18 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение пяти минут при  $400 \times g$  и окрашивали при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (ThermoFisher), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки центрифугировали и окрашивали при 4°C в течение 30 минут в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD326, анти-CD14, анти-CD11c, анти-CD3, анти-CD19, анти-CD56, анти-CD16, анти-HLADR, анти-CD40, анти-CD86 (ThermoFisher, Biolegend). Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (BD). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции. Моноциты идентифицировали как CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> клетки. Уровни активации CD14<sup>+</sup> моноцитов определяли по средней интенсивности флуоресценции.

[0585] Как показано на Фиг. 11, наблюдалась сильная индукция CD86 на

моноцитах человека при взаимодействии конъюгатов нектин-4-CpG с нектин-4-положительными опухолевыми клетками и моноцитами человека. Тестируемые конъюгаты антител представляли собой TNT264a, TNT265a, TNT266a, TNT267a и TNT169a. В целом, все конъюгаты CpG показали более высокую активность при тестировании на нектин-4-положительных опухолевых клетках по сравнению с нектин-4-отрицательными родительскими опухолевыми клетками DLD-1.

**Пример 12: Активация дендритных клеток конъюгатами антител к нектину-4-CpG.**

[0586] Trima-остатки получали от Vitalant и разбавляли 1:2 фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco). Разбавленную кровь наслаивали в пробирке на 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при  $400 \times g$ . PBMC собирали на границе раздела, ресуспендировали и промывали в FACS буфере (PBS с 0,5% BSA). После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной RPMI1640 (RPMI1640+10% FBS). PBMC сразу же высевали в 96-луночный планшет (0,5e6/луночка) в полной RPMI. Опухолевые клетки (0,025E6/луночка) из исходной линии клеток DLD-1, меченных CellTrace CFSE (ThermoFisher), или DLD-1, трансдуцированных для сверхэкспрессии нектин-4 и GFP, добавляли к PBMC при 20:1 (эффектор:мишень). К клеткам добавляли трехкратные серийные разведения от 300 нМ до 0,41 нМ конъюгатов нектин-4-CpG при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 18 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение пяти минут при  $400 \times g$  и окрашивали при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки центрифугировали и окрашивали при 4°C в течение 30 минут в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD326, анти-CD14, анти-CD11c, анти-CD3, анти-CD19, анти-CD56, анти-CD16, анти-HLADR, анти-CD40, анти-CD86 (ThermoFisher, Biolegend). Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (BD). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции. Дендритные клетки (DC) идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>HLADR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> клетки. Уровни активации DC определяли по средней интенсивности флуоресценции.

[0587] Как показано на Фиг. 12, взаимодействие конъюгатов нектин-4-CpG с нектин-4-положительными опухолевыми клетками и человеческими DC показали сильную индукцию CD40. Тестируемые конъюгаты антител представляли собой TNT264a, TNT265a, TNT266a, TNT267a и TNT169a. В отличие от этого, наблюдали ограниченную индукцию или отсутствие индукции CD40 в контексте нектин-4-отрицательных опухолевых клеток.

**Пример 13: Усиление фагоцитоза опухоли.**

[0588] Клетки CD14<sup>+</sup> человека очищали из Trima-остатков (Vitalant) с использованием Ficoll-Paque Plus (GE) и негативной селекции (Monocyte Isolation Kit II,



MilteNY Biotec) в соответствии с протоколами производителей. Происходящие из моноцитов макрофаги, поляризованные до M2-фенотипа, получали путем посева 10 миллионов CD14<sup>+</sup> клеток в 150-мм чашки для тканевых культур (Corning) в RPMI1640 с добавлением 10% FBS и 50 нг/мл MCSF (MilteNY Biotec). Клетки культивировали в течение 7-11 дней. Клетки-мишени DLD-1 трансдуцировали для сверхэкспрессии нектин-4 и GFP. Прикрепившиеся клетки отделяли от культуральных чашек при помощи TrypLE Select (Thermo Fisher). 100000 клеток-мишеней и 50000 макрофагов инкубировали в 96-луночных планшетах со сверхнизким прикреплением с U-образным дном (Corning) с трехкратными серийными разведениями от 1 мкМ до 1,37 нМ CpG олигонуклеотида или от 300 нМ до 0,41 нМ конъюгатов антител к нектину-4 при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 часов. Для проточной цитометрии клетки инкубировали в блокирующем FcR человека реагенте (MilteNY Biotec) и окрашивали флуорохром-мечеными антителами против CD33 и CD14 (ThermoFisher). Чтобы исключить из анализов адгезию макрофагов/клеток-мишеней включали антитело против CD326 (ThermoFisher). Кроме того, для отбора отдельных клеток использовался 'ворота' геометрии импульсов площади сигнала прямого рассеяния в зависимости от высоты. Для идентификации живых клеток использовали краситель Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher). Клетки собирали на проточном цитометре FACS Canto II (BD Biosciences) с последующим анализом с использованием программного обеспечения FlowJo 10.7 (BD). Процент фагоцитоза указывает процент жизнеспособных CD33+CD14<sup>+</sup> макрофагов, которые окрашиваются отрицательно на CD326 и положительно на CFSE.

[0589] Как показано на фиг. 13, наблюдался сильный фагоцитоз DLD-1 нектин-4 опухолевых клеток макрофагами с CpG конъюгатами против нектин-4. Тестируемые конъюгаты представляли собой TNT264a, TNT265a, TNT266a, TNT267a, TNT169a. Все конъюгаты показали существенно более высокую активность, тогда как неконъюгированный олигонуклеотид CpG (CpG 7-7), по-видимому, не приводил к обнаруживаемому фагоцитозу.

#### **Пример 14: Повышение секреции цитокинов.**

[0590] Trima-остатки получали от Vitalant и разбавляли 1:2 фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco). Разбавленную кровь наслаивали в пробирке на 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при 400 × g. PBMC собирали на границе раздела, ресуспендировали и промывали в FACS буфере (PBS с 0,5% бычьим сывороточным альбумином, Gibco). После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной RPMI1640 (RPMI1640+10% FBS, Gibco). PBMC сразу же высевали в 96-луночный планшет (1e6/луночка) в полной RPMI1640. Опухолевые клетки (0,025E6/луночка) из DLD-1, трансдуцированных для сверхэкспрессии нектин-4 и GFP, добавляли к PBMC при 20:1 (эффектор:мишень). К клеткам добавляли трехкратные серийные разведения от 300 нМ до 0,41 нМ конъюгатов антител к нектину-4 при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение пяти минут при 400 × g и супернатант собирали для определения количества цитокинов с

использованием иммуноанализа на основе микросфер BioLegend LEGENDplex™ Human Inflammation Panel 1 в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце, супернатант высевали в буфер для анализа перед добавлением цитокин-специфических захватывающих микросфер. Планшет инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре с последующими двумя промывками перед добавлением биотинилированного детекторного антитела в течение 1 часа. Без промывки в планшет добавляли PE-конъюгированный стрептавидин и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре с последующими двумя промывками перед добавлением буфера. Затем планшет для анализа обрабатывали методом проточной цитометрии с использованием цитометра Attune NxT (ThermoFisher). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo 10.7 (BD) и сводили в таблицы с использованием GraphPad Prism.

[0591] Как показано на Фиг. 14A-D, данные показали повышенную секрецию цитокинов при взаимодействии CpG-конъюгатов против нектин-4 с нектин-4-положительными опухолевыми клетками и РВМС для IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , IL6 и IL10. Тестируемые антитела представляли собой TNT-203, TNT-207, TNT-208 и TNT-210, а их соответствующие тестируемые конъюгаты представляли собой TNT-264a, TNT-265a, TNT-266a и TNT-267a, соответственно. Во всех случаях конъюгаты показали заметное улучшение по сравнению с соответствующими неконъюгированными антителами. Данные на Фиг. 14A-D представлены как кратное улучшение активности конъюгата по сравнению с соответствующим неконъюгированным антителом к нектину-4.

**Пример 15: Противоопухолевая активность конъюгатов антител к нектину-4.**

[0592] MC38 опухолевые клетки, экспрессирующие мышинный нектин-4 (MC38 нектин-4), получали путем ретровирусной трансдукции и нектин-4-экспрессирующие клетки отсортировывали и размножали. Экспрессию нектин-4 в трансдуцированных MC38 опухолевых клетках оценивали перед имплантацией с использованием TNT208, конъюгированного с AF647 (Thermo Scientific), в соответствии с протоколом изготовителя (Фиг. 16A). MC38 нектин-4 клетки мышинной карциномы толстой кишки культивировали в полной DMEM (DMEM+Glutamax+10% FBS (Gibco)) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки отделяли с использованием трипсина 0,25% (Gibco) и промывали два раза средой DMEM (Gibco). Клетки ресуспендировали при 20E6/мл в DMEM и хранили на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток подкожно имплантировали в правый бок 6-недельным самкам мышей C57BL/6 (Charles River). Размер опухоли измеряли и регистрировали два раза в неделю с использованием штангенциркуля, начиная с дня 4 после имплантации и до завершения испытания. Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле: (длина × ширина × ширина)/2. Когда средний размер опухолей достигал 80 мм<sup>3</sup>, примерно через 4 дня после имплантации, мышей рандомизировали по размеру опухоли и начинали обработку. Конъюгат антитела к нектину-4 в виде IgG2a мыши (TNT273a, который включает TNT153, конъюгированное с CpG4523 (SEQ ID NO:499)) вводили интраперитонеально 3 дозами с интервалом в 3 дня при 1, 3 или 10 мг/кг. Мышей, у

которых опухоли превышали 2000мм<sup>3</sup> или которые демонстрировали какие-либо признаки дистресса в любое время в период испытания, умерщвляли гуманным образом в соответствии с IACUC-одобренными протоколами по обращению с животными. CpG4523 представляет собой **tucgtcgtgacggtt-c3** (SEQ ID NO:499), где основания 1-5 связаны фосфоротиоатными связями, основания 5-6 связаны фосфотриэфирными связями, основания 6-14 связаны фосфоротиоатными связями, основание 2 представляет собой иод-уридин и основание 14 модифицировано с3.

[0593] Как показано на Фиг. 16А, экспрессия нектин-4 гетерогенна на трансдуцированных опухолевых клетках МС38 (левый пик обозначает неокрашенные клетки). На Фиг. 16В, системное введение конъюгата антитела к нектину-4 (TNT273a) показало сильную дозозависимую активность единого агента по сравнению с неконъюгированным антителом к нектину-4 (TNT153) на МС38 нектин-4 мышинной модели. Эрадикацию опухоли наблюдали при дозах 3 и 10 мг/кг у 2 из 4 или 3 из 5 мышей, соответственно. Эрадикация опухолей с различными уровнями экспрессии нектин-4, означает, что конъюгат антитела к нектину-4 может воздействовать на ряд опухолей, экспрессирующих нектин-4, включая опухоли, экспрессирующие низкие/средние уровни нектин-4. Это может происходить прямо и/или косвенно путем запуска иммунного ответа, который может быть нацелен на опухолевые клетки, экспрессирующие низкие/средние уровни нектин-4.

**Пример 16: Активация Т-клеток конъюгатами антител к нектину-4.**

[0594] Триа-остатки разбавляли 1:2 фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco). Разбавленную кровь наслаивали в пробирке на 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare) и пробирки центрифугировали в течение 30 минут при 400 × g. PBMC собирали на границе раздела, ресуспендировали и промывали в FACS буфере (PBS с 0,5% бычьим сывороточным альбумином; Gibco). После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной RPMI1640 (RPMI1640+10% FBS; Gibco). PBMC сразу помещали в 96-луночный планшет (при 0,5Е6 клеток/луночка) в полной RPMI1640. DLD-1 опухолевые клетки, трансдуцированные для сверхэкспрессии нектин-4 и GFP, добавляли к PBMC при 20:1 (соотношение эффектор:мишень; около 0,025Е6 опухолевые клеток/луночка). К клеткам добавляли трехкратные серийные разведения конъюгатов антител к нектину-4, от 300 нМ до 0,41 нМ, и инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 18 часов. После инкубации клетки осаждали центрифугированием в течение пяти минут при 400 × g и окрашивали при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки центрифугировали и окрашивали при 4°C в течение 30 минут в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD14, анти-CD11c, анти-CD3, анти-CD19, анти-CD56, анти-CD16, анти-HLADR, анти-CD40, анти-CD86 и анти-CD69 (ThermoFisher, Biolegend). Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (ThermoFisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7. Мертвые клетки исключали путем гейтирования

по eFluor 780-отрицательной популяции. Т-клетки идентифицировали как CD3<sup>+</sup> клетки. Уровни Т-клеточной активации оценивали по % повышению средней интенсивности флуоресценции относительно фона.

[0595] Испытываемые конъюгаты представляли собой TNT264a, TNT265a, TNT266a, TNT267a и TNT169a. Как показано на Фиг. 17, все конъюгаты, за исключением TNT169a, запускали сильную индукцию экспрессии CD69 на Т-клетках.

**Пример 17: Активация НК-клеток конъюгатами антител к нектину-4.**

[0596] Trima-остатки разбавляли 1:2 фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco). Разбавленную кровь наслаивали в пробирке на 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare) и пробирки центрифугировали в течение 30 минут при 400 × g. PBMC собирали на границе раздела, ресуспендировали и промывали в FACS буфере. После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной RPMI. PBMC затем сразу же помещали в 96-луночный планшет (при 0,5E6 клеток/луночка) в полной RPMI1640. Опухолевые клетки DLD-1, трансдуцированные для сверхэкспрессии нектин-4 и GFP, добавляли к PBMC при 20:1 соотношении эффектор:мишень (около 0,025E6 опухолевых клеток/луночка). К клеткам добавляли трехкратные серийные разведения, от 300 нМ до 0,41 нМ, конъюгатов антител к нектину-4 и инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 18 часов. Клетки затем осаждали центрифугированием в течение пяти минут при 400 × g и окрашивали при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (ThermoFisher), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки центрифугировали и окрашивали при 4°C в течение нескольких минут в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD14, анти-CD11c, анти-CD3, анти-CD19, анти-CD56, анти-CD16, анти-HLADR, анти-CD40, анти-CD86 и анти-CD69 (ThermoFisher, Biolegend). Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере. Затем клетки обрабатывали для внутриклеточного окрашивания с использованием концентрата и разбавителя для фиксации/пермеабиллизации для факторов транскрипции (eBioscience). Вкратце, клетки инкубировали в свежем буфере для фиксации путем смешивания 1 части концентрата для фиксации/пермеабиллизации с 3 частями разбавителя для фиксации и пермеабиллизации. Образцы инкубировали в течение 30-60 минут при температуре 4°C и защищали от света. Затем образцы центрифугировали при 600 × g в течение 5 минут при комнатной температуре. Осадки ресуспендировали в 1× буфере для пермеабиллизации с последующими двумя циклами промывки и центрифугированием при 600 × g в течение 5 минут при комнатной температуре. Клеточные осадки ресуспендировали в 100 мкл буфера для пермеабиллизации и окрашивали анти-IRF7 в течение 60 минут при комнатной температуре. Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (ThermoFisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7. Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции. НК-клетки идентифицировали как CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> клетки. Уровни активации НК-клеток определяли по средней интенсивности флуоресценции.

[0597] Испытываемые конъюгаты представляли собой TNT264a, TNT265a, TNT266a, TNT267a и TNT169a. Как показано на Фиг. 18, все конъюгаты, за исключением TNT169a, запускали сильную индукцию экспрессии CD69 на NK-клетках. Как показано на Фиг. 19, все конъюгаты запускали активацию экспрессии IRF7 NK-клетками, за исключением TNT265a и TNT169a, которые показали несколько более низкую активацию.

**Пример 18: Противоопухолевая активность конъюгатов антител к нектину-4.**

[0598] Опухолевые клетки MC38, экспрессирующие мышинный нектин-4 (MC38-нектин-4), получали путем ретровирусной трансдукции и сортировки на экспрессию нектин-4. MC38-нектин-4 клетки культивировали в полной DMEM (DMEM+Glutamax+10% FBS) при 37°C при 5% CO<sub>2</sub>. Клетки отделяли с использованием 0,25% трипсина (Gibco) и промывали два раза средой DMEM. Клетки ресуспендировали при 20E6 клеток/мл в DMEM и хранили на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток подкожно имплантировали в правый бок 6-недельным самкам мышей C57BL/6 (Charles River). Размер опухоли измеряли и регистрировали два раза в неделю с использованием штангенциркуля, начиная с дня 4 после имплантации и до завершения испытания. Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле: (длина × ширина × ширина)/2. Когда средний размер опухолей достигал 70 мм<sup>3</sup>, примерно через 4 дня после имплантации, мышей рандомизировали по размеру опухоли и начинали обработку. Конъюгаты антител к нектину-4 в виде IgG2a мыши (TNT302a, TNT303a, TNT304a и TNT273a) вводили интраперитонеально 3 дозами с интервалом в 3 дня при 3 мг/кг. Мышей, у которых опухоли превышали 2000мм<sup>3</sup> или которые демонстрировали какие-либо признаки дистресса в любое время, умерщвляли гуманным образом в соответствии с IACUC-одобренными протоколами по обращению с животными.

[0599] Испытываемые конъюгаты представляли собой TNT302a, TNT303a, TNT304a и TNT237a. Олигонуклеотид, конъюгированный с антителами, CpG4523, представляет собой tucgtcgtgacggtt-c3 (SEQ ID NO:499), где основания 1-5 связаны фосфоротиоатными связями, основания 5-6 связаны фосфотриэфирными связями, основания 6-14 связаны фосфоротиоатными связями, основание 2 представляло собой иод-уридин и основание 14 модифицировано c3.

[0600] Как показано на Фиг. 20A и 20B, конъюгаты антител к нектину-4 проявляют сильную активность в качестве единого агента на мышинной модели MC38-нектин-4. Как показано на Фиг. 20A, как TNT303a, так и TNT304a продемонстрировали значительно более высокую активность единого агента по сравнению с TNT273a. Эрадикация опухоли наблюдалась при дозе 3 мг/кг. Например, в конечной временной точке 2 из 5 мышей, обработанных TNT304a, не имели опухолей (tumor free (TF)) (TF 2/5), и 1 из 5 мышей, обработанных TNT273a, не имела опухоли (TF 1/5). В другом эксперименте, как показано на фиг. 20B, TNT303a продемонстрировал превосходную активность по сравнению с TNT302a, с полным уничтожением опухоли, и все обработанные мыши не имели опухолей (TF 5/5).

**Пример 19: Получение дополнительных антитела к нектину-4.**

[0601] Гибридомы создавали с использованием адаптированных протоколов, описанных Kohler и Milstein (*Nature*, 1975;256:495-497). Вкратце, трансгенных мышей АММ-ХКЛ (Ablexis, California, United States) еженедельно иммунизировали 50 мг ECD нектин-4 человека (обозначенного TNT-175), смешанного с полученным на месте коктейлем агонистов TLR, состоящим из ODN 1826, Poly(I:C), резиквинода и MPL® (монофосфориллипид А). Пути иммунизации включали подкожное введение в паховую область, заднюю часть шеи, основание хвоста, а также в пяточный сустав и интраперитонеальное введение. У мышей ежемесячно брали кровь до достижения желаемых титров. Иммунные клетки собирали у 3 мышей из селезенки и дренирующих лимфатических узлов и объединяли. Клетки, экспрессирующие CD138, выделяли из этого пула клеток с использованием набора для положительной селекции CD138 мыши (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) в соответствии с протоколом изготовителя. Выделенные клетки сливали с клетками миеломы мыши (ATCC CRL2016™) с использованием системы электропорации ECM™ 2001 (BTX, Holliston, MA, United States), как описано STEMCELL Technologies. Слитые клетки центрифугировали, ресуспендировали в полутвердой селективной среде с гипоксантином, аминоптерином и тимидином (HAT) (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada), смешанной с 10 мг/мл козьего антимышиного IgG Fc FITC (JacksonImmuno, West Grove, PA, United States) и высевали в NUNC™ OMNITRAYSTM ((ThermoFisher, Waltham MA, United States). Планшеты инкубировали при 37°C с 7% CO<sub>2</sub> в течение одной недели. Планшеты визуализировали и флуоресцентные клоны собирали в среду E (STEMCELL Technologies) с использованием системы сбора колоний CLONPIX® 2 (Molecular Devices, San Jose, CA, United States). Отобранные клоны инкубировали при 37°C с 7% CO<sub>2</sub> до слияния.

[0602] Супернатант отобранных клонов проверяли на связывание с ECD нектин-4 человека (TNT-175) посредством прямого ELISA. Положительные клоны подвергали встречному скринингу по HIS-метке и проверяли на перекрестную реактивность с мышиным нектином-4 (TNT-250). Положительные клоны снова распределяли по порядку и дополнительно охарактеризовывали методом SPR.

[0603] Вариабельные области подтвержденных гибридных клонов амплифицировали с использованием модифицированного протокола 5'RACE. Вкратце, РНК выделяли с использованием набора для очистки PURELINK™ Pro 96 (Invitrogen, Waltham, MA, United States) в соответствии с протоколом производителя. Во время подготовки все реакции хранили на льду. Обратную транскрипцию осуществляли с использованием набора MAXIMA™ H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) в соответствии с инструкциями производителя, с добавлением ген-специфических праймеров в константные домены вариабельных тяжелых и легких цепей мыши. PolyA хвост добавляли к синтезированной кДНК при помощи терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя, используя праймер для прикрепления. Затем кДНК вариабельной области амплифицировали с использованием прямого праймера Oligo dT и вложенного обратного

праймера, расположенного в константном домене области тяжелой или легкой цепи. Реакция амплификации включала 1 мкл синтезированной кДНК, 1 мкл 10 мкМ прямого праймера, 1 мкл 10 мкМ обратного праймера, 22 мкл H<sub>2</sub>O и 25 мкл DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific). ПЦР осуществляли в следующих условиях термоциклера: 1 цикл 95°C в течение 2 минут; 30 циклов 94°C в течение 30 секунд, 56°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 1 минуты, затем 1 цикл 72°C в течение 10 минут и 1 цикл 4°C постоянно. Ампликоны подтверждали электрофорезом с использованием 2% агарозного Е-геля (Invitrogen) и визуализировали в УФ-свете. Ампликоны очищали с использованием набора для очистки ПЦР MinElute 96UF (Qiagen) и ресуспендировали в 50 мкл молекулярно чистой воды (MilliQ). Ампликоны были отправлены для секвенирования по Сэнгеру в Elim Labs (Hayward, CA) с вложенными праймерами для обратного секвенирования. Последовательности анализировали с использованием Geneious Biologics ((Biomatters, Auckland, New Zealand). Были идентифицированы и отобраны уникальные последовательности для дальнейшей характеристики.

[0603] Отобранные клоны включают клоны, обозначенные как TNT-317, TNT-318, TNT-320, TNT-321, TNT-322, TNT-323, TNT-324, TNT-327, TNT-328, TNT-330, TNT-331, TNT-332, TNT-333, TNT-334, TNT-335 и TNT-336. Последовательности VH, VL и CDR представлены в Таблицах 7-11 выше.

**Пример 20: Характеристика антител - измерение аффинности и биннинг эпитопов.**

[0605] Этот пример сравнивает антитела к нектину-4 примеров и определяет эпитоп нектин-4, который они распознают, и их связывание с нектином-4 человека, мыши и обезьяны *synomolgus*.

[0606] Определение K<sub>D</sub> аффинности: Все эксперименты осуществляли при 25°C с использованием высокопроизводительной и высокочувствительной системы SPR Biacore 8K (Cytiva, Global Life Sciences Solutions USA LLC, Marlborough, MA), оснащенной сенсорными чипами S-типа. Рабочий буфер представлял собой 10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% (об/об) поверхностно-активного вещества P20 (HBS-EP+). Взаимодействие различных моноклональных антител к нектину-4 с рекомбинантным белком нектин-4-ECD-6xHis человека (TNT-175) анализировали путем пропускания нектин-4-ECD через захваченное белком А антитело против нектин-4 на сенсорном чипе Biacore Series S Protein A. Аналиты нектин-4 вводили либо в режиме одноциклового кинетики, либо в режиме многоциклового кинетики при номинальных начальных концентрациях 300 нМ или 900 нМ с 3-кратными серийными разведениями. Время ассоциации контролировали в течение 120 сек, а время диссоциации контролировали в течение 1800 сек при скорости потока 30 мкл/мин. Поверхности восстанавливали с использованием 10 мМ глицина при pH 1,7 или 75 мМ фосфорной кислоты при pH 1,6 в течение двух импульсов по 15 сек при скорости потока 30 мкл/мин. Тестируемыми аналитами были ECD нектин-4 человека (TNT-175), IgV нектин-4 человека (TNT-252), ECD нектин-4 мыши (TNT-250) или ECD нектин-4 мыши (TNT-176) и ECD нектин-4

суно (TNT-255).

[0607] Данные были обработаны и проанализированы с использованием программного обеспечения Biacore 8K Evaluation Software версии 3.0.12.15655 (Cytiva, Global Life Sciences Solutions USA LLC, Marlborough, MA). Исходные ответы из проточной кюветы 1 вычитались из активных ответов из проточной кюветы 2 с получением вычитенных данных (2-1). Ответы при введении наиболее близкого холостого буфера затем вычитались из ссылочных вычитенных данных (2-1) с получением данных двойной ссылки. Эти данные двойной ссылки подгоняли к простой модели связывания Ленгмюра 1:1 с массопереносом для определения кажущихся констант скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ). Кажущуюся равновесную константу диссоциации или константу аффинности затем рассчитывали на основании их соотношения ( $K_D = k_d/k_a$ ).

[0608] Биннинг эпитопов: SPR биннинг эксперименты осуществляли путем иммобилизации различных антител к нектину-4 на чипе Biacore CM5 методом аминного связывания в качестве лиганда и с использованием 300 нМ антигена ECD нектин-4 человека (TNT-175) или 300 нМ TNT-175 плюс 3 мкМ конкурирующего антитела в качестве аналита в растворе. Считалось, что антитело-лиганд и конкурирующее антитело находятся в одном и том же бине, когда положительное связывание наблюдалось только в присутствии ECD нектин-4 человека, но не в присутствии высокой концентрации конкурирующего антитела.

[0609] Таблица 24 ниже показывает аффинность связывания с ECD нектин-4 человека, IgV доменом нектин-4 человека, ECD нектин-4 мыши и ECD нектин-4 суно. Кроме того, показаны результаты биннинга эпитопов. Кажущиеся  $K_D$  аффинности антител в отношении ECD нектин-4 человека составляли от ~1нМ до 260нМ. Все антитела связывались с IgV доменом нектин-4 человека, за исключением TNT-317, TNT-318, TNT-322, TNT-323, TNT-328, TNT-331, TNT-332 и TNT-333. Все антитела связывались с ECD нектин-4 суно, за исключением TNT-336. Большинство антител связывались с ECD нектин-4 мыши, за исключением TNT-317, TNT-318, TNT-320, TNT-321, TNT-322, TNT-323, TNT-324, TNT-327, TNT-328, TNT-330, TNT-331, TNT-332, TNT-333, TNT-334, TNT-335 и TNT-336.

**Таблица 24**

**Аффинность и биннинг эпитопов антител к нектину-4**

| Антитело | Аффинность ( $K_D$ , M) |                       |                   |                   | Биннинг |
|----------|-------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|---------|
|          | ECD нектин-4 человека   | IgV нектин-4 человека | ECD нектин-4 мыши | ECD нектин-4 Суно |         |
| TNT-201  | 6,05E-09                | 4,39E-09              | 2,09E-08          | 1,67E-08          | Бин1    |
| TNT-202  | 1,48E-08                | 1,34E-08              | 2,34E-08          | 2,56E-08          | Бин1    |



|                 |          |          |          |          |      |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|------|
| TNT-203         | 1,01E-07 | 1,38E-07 | 1,96E-07 | 1,72E-07 | Бин1 |
| TNT-204         | 2,08E-09 | 6,82E-09 | 4,34E-09 | 1,02E-08 | Бин1 |
| TNT-205         | 5,39E-08 | 7,53E-08 | 8,20E-07 | 7,27E-07 | Бин1 |
| TNT-206         | 1,77E-08 | 1,87E-08 | 1,87E-08 | 2,35E-08 | Бин1 |
| TNT-207         | 1,37E-09 | 1,77E-09 | 5,07E-09 | 4,19E-09 | Бин1 |
| TNT-208         | 4,56E-09 | 5,43E-09 | 1,86E-08 | 1,19E-08 | Бин1 |
| TNT-209         | 1,75E-08 | 2,89E-08 | 3,31E-07 | 5,50E-08 | Бин1 |
| TNT-210         | 1,33E-08 | 1,75E-08 | 1,50E-08 | 3,67E-08 | Бин1 |
| TNT-211         | 2,43E-08 | 2,43E-08 | 6,84E-08 | 4,89E-08 | Бин1 |
| TNT-154/TNT-212 | 8,69E-09 | 9,88E-09 | low      | 4,05E-08 | Бин1 |
| TNT-317         | 1,57E-08 | NB       | NB       | 1,83E-08 | Бин2 |
| TNT-318         | 2,60E-07 | NB       | NB       | 2,11E-07 | -    |
| TNT-320         | 1,84E-08 | 9,91E-09 | NB       | 3,59E-08 | Бин1 |
| TNT-321         | 1,40E-08 | 1,16E-08 | NB       | 5,60E-08 | Бин1 |
| TNT-322         | 5,79E-08 | NB       | NB       | 5,15E-08 | -    |
| TNT-323         | 9,00E-09 | NB       | NB       | 8,67E-09 | Бин2 |
| TNT-324         | 6,45E-08 | 3,07E-08 | NB       | 2,44E-08 | Бин1 |
| TNT-327         | 3,63E-09 | 1,64E-09 | NB       | 2,85E-09 | Бин3 |
| TNT-328         | 1,59E-09 | NB       | NB       | 1,78E-09 | Бин2 |
| TNT-330         | 1,64E-08 | 7,30E-09 | NB       | 1,37E-08 | Бин3 |
| TNT-331         | 8,74E-08 | NB       | NB       | 3,28E-08 | Бин2 |
| TNT-332         | 7,60E-09 | NB       | NB       | 7,20E-09 | Бин4 |

|                                 |          |          |          |          |      |
|---------------------------------|----------|----------|----------|----------|------|
| TNT-333                         | 6,18E-09 | NB       | NB       | 7,43E-09 | Бин2 |
| TNT-334                         | 7,15E-08 | 4,63E-08 | NB       | 9,53E-08 | Бин1 |
| TNT-335                         | 1,83E-09 | 9,85E-10 | NB       | 1,28E-09 | Бин1 |
| TNT-336                         | 1,11E-07 | 1,04E-07 | NB       | NB       | -    |
| TNT-337                         | 2,17E-07 | 1,95E-07 | 3,18E-07 | 2,86E-07 | Бин1 |
| TNT-412                         | 7,66E-09 | -        | 1,36E-08 | 6,43E-09 | Бин1 |
| TNT-412<br>(нефукозилированное) | 7,54E-09 | -        | 1,31E-08 | 5,99E-09 | Бин1 |

NB=отсутствие связывания; LB=низкое связывание; “-“=не осуществляли

**Пример 21: Клеточное связывание с нектином-4 человека и нектином-1 человека.**

[0610] Этот пример показывает связывание антител, описанных выше, с различными нектин-4-экспрессирующими клеточными линиями или нектин-1-экспрессирующими клеточными линиями.

[0611] Связывание антител к нектину-4 с клетками: нектин-4-положительные клетки HT-1376, T47-D и SKBR3 получали из ATCC и культивировали в соответствии с их протоколами. DLD-1 трансдуцировали для сверхэкспрессии нектина-4 и GFP и культивировали в соответствии с протоколами ATCC. Клетки отделяли с использованием TrypLE (Gibco) и промывали при центрифугировании в течение пяти минут при  $400 \times g$  FACS буфером (фосфатно-солевой буферный раствор, Gibco+2% фетальной бычьей сыворотки, Gibco). Клетки ресуспендировали в FACS буфере, высевали в 96-луночный планшет (0,25 еб/луночка) затем осаждали центрифугированием в течение пяти минут при  $400 \times g$ . Клетки окрашивали при  $4^{\circ}C$  в красителе Fixable Viability Dye eFluor 506 (eBioscience), разведенном 1:2000 в PBS. Антитела к нектину-4 метили AlexaFluor-647 (AF647) с использованием набора для мечения белков (Invitrogen) в соответствии с протоколом изготовителя. Вкратце, 50 мкг антитела в PBS инкубировали с реактивными красящими реагентами при осторожном встряхивании при комнатной температуре в течение 1 часа. Невключившиеся красители удаляли эксклюзионной хроматографией с использованием смол для очистки и колонок, представленных в наборах. Клетки центрифугировали и окрашивали в течение 60 минут при  $4^{\circ}C$  в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec) и AF647-конъюгированные антитела к нектину-4. Клетки центрифугировали, промывали два раза FACS буфером и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре

Attune NxT (ThermoFisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (BD). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 506-отрицательной популяции. Связывание оценивали по средней интенсивности флуоресценции.

[0612] Все антитела к нектину-4 связывались с эндогенно экспрессирующимся нектином-4 в HT-1376, T47-D и SKBR3 клеточных линиях, за исключением TNT-318 и TNT-325, которые показали худшее связывание по сравнению с другими антителами. Результаты для SKBR3 показаны на Фиг. 21.

[0613] Специфичность активации нектин-4 на нектин-1 клетках: MM1R клетки, которые являются нектин-1-положительными и нектин-4-отрицательными, получали из ATCC и культивировали в соответствии с их протоколами. Нектин-1-отрицательные DLD-1 трансдуцировали для сверхэкспрессии нектин-4 и GFP и культивировали в соответствии с протоколами ATCC. Plateletpheresis Leukoreduction Chamber (LRS камера) получали от Vitalant и разбавляли PBS 1:3. Разбавленную кровь наслаивали в пробирке на 12 мл Ficoll-Paque. Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при  $400 \times g$ . PBMC собирали на границе раздела, ресуспендировали и промывали в FACS буфере (PBS с 0,5% BSA). После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной RPMI1640 (RPMI1640+10% FBS). PBMC сразу же высевали в 96-луночный планшет (0,5e6/луночка) в полной RPMI. Опухолевые клетки (0,025E6/луночка) из MM1R, меченных CellTrace CFSE (ThermoFisher), или DLD-1, трансдуцированных для сверхэкспрессии нектин-4 и GFP, добавляли к PBMC при 20:1 (эффектор:мишень). К клеткам добавляли трехкратные серийные разведения, от 300 нМ до 0,41 нМ, антитела к нектину-4 отдельно и конъюгаты антитело-СрG при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 18 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение пяти минут при  $400 \times g$  и окрашивали при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (ThermoFisher), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки центрифугировали и окрашивали при 4°C в течение 30 минут в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD14, анти-CD11c, анти-CD3, анти-CD19, анти-CD56, анти-CD16, анти-HLADR, анти-CD69, анти-CD86 (ThermoFisher, Biolegend). Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (BD). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции. Т-клетки идентифицировали как CD3<sup>+</sup> клетки, моноциты идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> клетки, а дендритные клетки (DC) идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> клетки. Уровни активации Т-клеток, моноцитов и DC определяли по средней интенсивности флуоресценции.

[0614] Конъюгаты антитело-СрG получали с использованием способов, описанных в Примере 10. TNT-266a был специфическим для активации нектин-4-положительных клеток (DLD-1), при этом активация в нектин-1-положительных клетках (MM1R) не

наблюдалась. Никакой активации не наблюдали с неконъюгированным антителом TNT-208 в обеих клеточных линиях DLD-1 и MM1R, как ожидалось.

**Пример 22: Интернализация антител.**

[0615] Этот пример показывает сравнение интернализации между антителами к нектину-4.

[0616] Интернализацию сначала осуществляли с использованием клеточной линии T47D с эндогенно экспрессируемым нектином-4. Затем субпопуляцию антител также испытывали с использованием экзогенно трансдуцированных нектин-4 DLD клеток. Антитела, обозначенные как TNT-154, TNT-208, TNT-317, TNT-318, TNT-327, TNT-328, TNT-330, TNT-333 и TNT-336, метили AlexaFluor-647 (AF647) с использованием набора для мечения белков (Invitrogen) в соответствии с протоколом изготовителя. Вкратце, 100 мкг антитела в PBS инкубировали с реактивными красящими реагентами при осторожном встряхивании при комнатной температуре в течение 1 часа. Невключившиеся красители удаляли эксклюзионной хроматографией с использованием смол для очистки и колонок, представленных в наборах. Экспрессирующие нектин-4 человека клетки T47D получали из ATCC и культивировали в соответствии с их рекомендациями. DLD-1 трансдуцировали для сверхэкспрессии нектин-4 и GFP и культивировали в соответствии с протоколами ATCC. Клетки отделяли с использованием TrypLE (Gibco) и промывали при центрифугировании в течение пяти минут при  $400 \times g$  FACS буфером (фосфатно-солевой буферный раствор, Gibco+1% бычьего сывороточного альбумина, Gibco). Клетки ресуспендировали в FACS буфере и окрашивали при помощи 10 мкг меченного антитела к нектину-4 в течение 60 минут при 4°C. Клетки промывали два раза FACS буфером и ресуспендировали в 1мл FACS буфера на образец. Клетки хранили на льду в темноте до тех пор, пока пробирку с 100 мкл аликвотой на образец не переносили в инкубатор при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в момент времени -3 часа, -2 часа, -1 час, -30 минут, -15 минут, -5 и -0 минут для интернализации таким образом, чтобы все временные точки были завершены одновременно. После удаления из инкубатора клетки промывали буфером FACS, затем разделяли на 2 аликвоты, одну из которых ресуспендировали в 100 мкл папаина (папаин из латекса папайи, Sigma) при 23,9 Ед/мл, разведенного в PBS (Gibco), а другую ½ ресуспендировали в 100 мкл PBS и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Клетки затем промывали и окрашивали в течение 30 минут при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 506 (eBioscience), разведенном 1:2000 в PBS (Gibco). Клетки снова промывали FACS буфером и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (ThermoFisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (BD). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 506-отрицательной популяции. Образцы определяли по средней интенсивности флуоресценции для каждой временной точки. Образцы, которые не инкубировали с папаином, использовали в качестве контроля “отсутствие интернализации” и, таким образом, считали, что они имеют 100% антитело-AlexaFluor-647, локализованного на клеточной поверхности. Клетки из временной точки -0 минут,

которые инкубировали при 37°C с папаином, использовали в качестве отрицательного контроля. Интернализированное антитело выражали в виде процента, рассчитанного как разница между расщепленным папаином образцом минус отрицательный контроль и локализованным на поверхности антителом при 37°C минус отрицательный контроль.

[0617] Результаты показаны на Фиг. 22. Все протестированные антитела к нектину-4 в различной степени интернализуются обеими клеточными линиями (T47D и нектин-4-DLD), за исключением TNT-318 и TNT-336, которые продемонстрировали плохую интернализацию в T47D по сравнению с другими антителами.

**Пример 23: Активация иммунных клеток конъюгатами антител к нектину-4.**

[0618] Этот пример демонстрирует активацию иммунных клеток некоторыми антителами к нектину-4, описанными выше, и корреляцию активности с уровнем экспрессии нектин-4.

[0619] HT1376, OE19 и H292 клетки, экспрессирующие высокие, средние и низкие уровни нектин-4, соответственно, получали из ATCC и культивировали в соответствии с их протоколами. DLD-1 трансдуцировали для сверхэкспрессии нектин-4 и GFP и культивировали в соответствии с протоколами ATCC. Plateletpheresis Leukoreduction Chamber (LRS камера) получали от Vitalant и разбавляли PBS 1:3. Разбавленную кровь наслаивали в пробирке на 12 мл Ficoll-Paque. Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при  $400 \times g$ . PBMC собирали на границе раздела, ресуспендировали и промывали в FACS буфере (PBS с 0,5% BSA). После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной RPMI1640 (RPMI1640+10% FBS). Опухолевые клетки (0,025E6/лунка) метили CellTrace CFSE (ThermoFisher) и высевали в 96-луночный планшет в полной среде RPMI. К целевым клеткам добавляли трехкратные серийные разведения конъюгатов антител к нектину-4, от 300 нМ до 0,41 нМ, и инкубировали при 37°C в течение 20 минут. Свежевыделенные PBMC (0,5e6/лунка) в полной RPMI добавляли в лунки при 20:1 (эффектор:мишень) и инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 18 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение пяти минут при  $400 \times g$  и окрашивали при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (ThermoFisher), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки промывали 1x FACS буфером и центрифугировали и окрашивали при 4°C в течение 30 минут в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD14, анти-CD11c, анти-CD3, анти-CD19, анти-CD56, анти-CD16, анти-HLADR, анти-CD69, анти-CD86 (ThermoFisher, Biolegend). Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (BD). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции. Т-клетки идентифицировали как CD3<sup>+</sup> клетки, моноциты идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> клетки, NK-клетки идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> клетки, а дендритные клетки (DC) идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> клетки. Уровни активации Т-клеток, моноцитов, NK и DC клеток определяли по средней

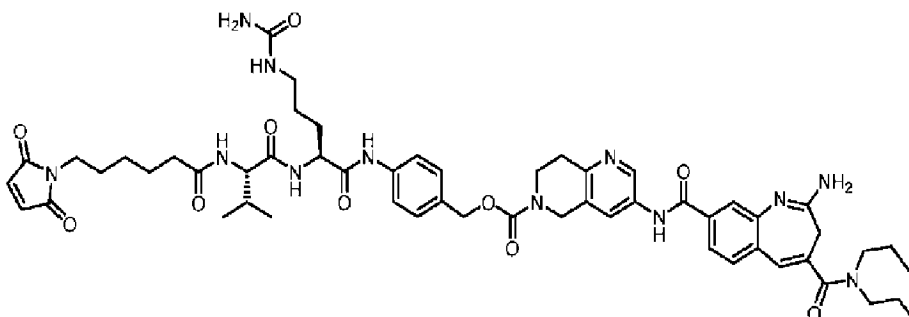
интенсивности флуоресценции.

[0620] Результаты показаны на Фиг. 23-27. Активацию Т-клеток, НК, DC и моноцитов нектин-4-СрG конъюгатами оценивали в экспериментах, включающих совместное культивирование РВМС с 4 раковыми клеточными линиями с различными уровнями экспрессии нектин-4 (нектин-4-DLD >> HT1376 > OE19 > H292). В 4 испытанных клеточных линиях все СрG-конъюгированные антитела к нектину-4 имели повышенную активацию по сравнению с обработкой носителем как для врожденного, так и адаптивного путей на основе оцениваемых иммунных клеток. TNT-266а имел более высокие уровни активации Т-клеток, НК-клеток, моноцитов и DC по сравнению с другими конъюгированными антителами в DLD-1 клетках, сверхэкспрессирующих нектин-4 (Фиг. 23). Интересно, что уровни активации Т-клеток, НК-клеток, моноцитов и DC в экспериментах с совместным культивированием с OE19 сопоставимы между TNT266а, TNT349а, TNT350а и TNT351а (Фиг. 24). TNT354а и TNT266а показали несколько более высокие уровни активации по сравнению с TNT358а во всех типах клеток (Т, НК, моноцитах и DC) в экспериментах с совместным культивированием с использованием DLD-1 клеток, сверхэкспрессирующих нектин-4 (Фиг. 25). Интересно, что TNT354а, как наблюдалось, демонстрирует более высокие уровни активации Т, НК и DC в экспериментах с совместным культивированием с использованием HT1376 и H292 по сравнению с TNT-358а и TNT-266а (Фиг. 26 и Фиг. 27).

#### Пример 24: Сравнение иммуноактивирующих конъюгатов.

[0621] Этот пример исследует механизмы для иммунной активации некоторыми антителами к нектину-4.

[0622] Сравнение с конъюгатом нектин-4-TLR8. В целях сравнения агонист TLR8 (см. структуру ниже) синтезировали для конъюгации с антителом к нектину-4 (TNT-337), экспрессируемым транзientно в клеточной линии млекопитающего 293. Антитело очищали с использованием стандартного метода очистки с белком А. Молекулу конъюгата антитело-агонист TLR8 (обозначен как TNT-347xx) получали путем восстановления цистеинов на антителе с использованием TCEP при 37°C в течение 1,5 часов с последующей инкубацией с 6-10-молярным избытком агониста TLR8 с малеиамидным фрагментом при комнатной температуре в течение 3-6 часов. Реакцию гасили L-цистеином при комнатной температуре в течение 30 минут, а затем обессоливали с использованием спин-колонок Zeba. Конечный конъюгат имел DAR 2,5 по данным MS-анализа.



[0620] OE19 клетки получали из ATCC и культивировали в соответствии с их протоколами. Plateletpheresis Leukoreduction Chamber (LRS камера) получали от Vitalant и разбавляли PBS 1:3. Разбавленную кровь наслаивали в пробирке на 12 мл Ficoll-Paque. Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при  $400 \times g$ . PBMC собирали на границе раздела, ресуспендировали и промывали в FACS буфере (PBS с 0,5% BSA). После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной RPMI1640 (RPMI1640+10% FBS). Опухолевые клетки (0,025E6/лунка) метили CellTrace CFSE (ThermoFisher) и высевали в 96-луночный планшет в полной среде RPMI. К целевым клеткам добавляли трехкратные серийные разведения TNT-208, конъюгата TNT-208-CpG, TNT-337 и TNT-347xx, от 300 нМ до 0,41 нМ, и инкубировали при 37°C в течение 20 минут. Свежевыделенные PBMC (0,5e6/лунка) в полной RPMI добавляли в лунки при 20:1 (эффектор:мишень) и инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 18 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение пяти минут при  $400 \times g$  и окрашивали при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (ThermoFisher), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки промывали 1x FACS буфером и центрифугировали и окрашивали при 4°C в течение 30 минут в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD14, анти-CD11c, анти-CD3, анти-CD19, анти-CD56, анти-CD16, анти-HLADR, анти-CD123, анти-CD40, анти-CD69 и анти-CD86 (ThermoFisher, Biolegend). Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения FlowJo 10.7 (BD). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции. Т-клетки идентифицировали как CD3<sup>+</sup> клетки, моноциты идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> клетки, NK-клетки идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> клетки, плазмацитоидные дендритные клетки (pDC) идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> клетки и дендритные клетки (DC) идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> клетки. Уровни активации Т, моноцитов, NK, pDC и DC определяли по средней интенсивности флуоресценции.

[0620] Результаты показаны на Фиг. 28. В различных типах миелоидных линий, а также в Т- и NK-эффекторных клетках TNT-266a имел более высокие уровни активации по сравнению с TNT-347xx конъюгатом TLR8-антитело в нектин-4-экспрессирующих клетках OE19.

[0625] Сравнение с конъюгатом антитело нектину-4-ММАЕ. Для сравнения получали конъюгат направленного на нектин-4 антитела и лекарственного средства, состоящий из полностью человеческого антитела к нектину-4 IgG1 каппа, конъюгированного с низкомолекулярным разрушающим микротрубочки средством, монометилауристатином E, через протеаза-расщепляемый малеимидокапроил-валин-цитруллин-линкер (обозначается как mc-vc-PAV-ММАЕ). Последовательности, кодирующие антитела против нектин-4, были синтезированы компанией ATUM (Newark, CA). Белок антитела TNT-212 получали путем транзientной экспрессии в клеточной

линии млекопитающего 293. Антитело очищали с использованием стандартного метода очистки с белком А. Ведотин-линкер-полезную нагрузку конъюгировали с межпочечными цистеиновыми остатками, которые содержат межпочечные дисульфидные связи антитела, с получением продукта с соотношением лекарственного средства и антитела примерно 3,8:1. Конъюгированный ADC был обозначен как TNT-381xx.

[0626] Опухолевые клетки MC38, экспрессирующие мышинный нектин-4 и GFP (MC38 нектин-4), получали путем ретровирусной трансдукции и нектин-4-экспрессирующие клетки отсортировывали и размножали. Клетки MC38-нектин-4 мышинной карциномы толстой кишки культивировали в полной DMEM (DMEM+Glutamax+10% FBS (Gibco)) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки отделяли с использованием трипсина 0,25% (Gibco) и промывали два раза средой DMEM (Gibco). Клетки ресуспендировали при 20E6/мл в DMEM и хранили на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток подкожно имплантировали в правый бок 6-недельным самкам мышей C57BL/6 (Charles River). Размер опухоли измеряли и регистрировали два раза в неделю с использованием штангенциркуля, начиная с дня 4 после имплантации и до завершения испытания. Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле: (длина × ширина × ширина)/2. Когда средний размер опухолей достигал 73 мм<sup>3</sup>, примерно через 4 дня после имплантации, мышей рандомизировали по размеру опухоли и начинали обработку. TNT-348a вводили интраперитонеально 3 дозами с интервалом в 3 дня при 10 или 3 мг/кг; TNT-381xx вводили внутривенно 3 дозами с интервалом в 3 дня при 10 мг/кг. Мышей, у которых опухоли превышали 2000мм<sup>3</sup> или которые демонстрировали какие-либо признаки дистресса в любое время в период испытания, умерщвляли гуманным образом в соответствии с IACUC-одобренными протоколами по обращению с животными.

[0627] Результаты показаны на Фиг. 29. Системное введение TNT-348a показало сильную активность единого агента в мышинной модели MC38-нектин-4. TNT-348a при обеих дозах 10 и 3 мг/кг показал более высокую активность единого агента по сравнению с TNT-381xx, который вводили при однократной дозе 10 мг/кг.

**Пример 25: Конъюгаты нефукозилированных антител к нектину-4.**

[0626] Нефукозилированный вариант TNT-208 можно получить с использованием технологии нокаута, нокдауна (например, miFuc технологии) или экспрессии в присутствии соединения 2-фторфукозы в транзientной клеточной линии млекопитающего 293. Нефукозилированное TNT-208 антитело очищали с использованием стандартного метода очистки с белком А и конъюгировали с CpG 7-7 после такого же одностадийного способа конъюгации с использованием фермента mTG (микробная трансглутаминаза), описанного в Примере 10. Нефукозилированное антитело TNT-208, конъюгированное с CpG 7-7, обозначается как TNT-363a, тогда как фукозилированное антитело (TNT-208), конъюгированное с CpG 7-7, обозначается как TNT-266a.

[0629] DLD-1 трансдуцировали для сверхэкспрессии нектина-4 и GFP и культивировали в соответствии с протоколами ATCC. Plateletpheresis Leukoreduction



Chamber (LRS камера) получали от Vitalant и разбавляли PBS 1:3. Разбавленную кровь наслаивали в пробирке на 12 мл Ficoll-Paque. Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при  $400 \times g$ . PBMC собирали на границе раздела, ресуспендировали и промывали в FACS буфере (PBS с 0,5% BSA). После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной RPMI1640 (RPMI1640+10% FBS). Опухолевые клетки (0,025E6/лунка) метили CellTrace CFSE (ThermoFisher) и высевали в 96-луночный планшет в полной среде RPMI. К целевым клеткам добавляли трехкратные серийные разведения TNT-266a и TNT-263a, от 300 нМ до 0,41 нМ, и инкубировали при 37°C в течение 20 минут. Свежевыделенные PBMC (0,5e6/лунка) в полной RPMI добавляли в лунки при 20:1 (эффектор:мишень) и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 18 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение пяти минут при  $400 \times g$  и окрашивали при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (ThermoFisher), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки промывали 1x FACS буфером и центрифугировали и окрашивали при 4°C в течение 30 минут в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD14, анти-CD11c, анти-CD3, анти-CD19, анти-CD56, анти-CD16, анти-HLADR, анти-CD69, анти-CD86 (ThermoFisher, Biolegend). Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (ThermoFisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (BD). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции. Т-клетки идентифицировали как CD3<sup>+</sup> клетки, моноциты идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> клетки, NK-клетки идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> клетки и дендритные клетки (DC) идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> клетки. Уровни активации Т-клеток, моноцитов, NK-клеток и DC определяли по средней интенсивности флуоресценции.

[0630] Результаты показаны на Фиг. 30. В присутствии DLD-1, сверхэкспрессирующих нектин-4, нефукозилированное антитело к нектину-4, конъюгированное с CpG (TNT-363a), имело несколько более высокую активацию Т-клеток и NK-клеток по сравнению с нефукозилированным антителом к нектину-4, конъюгированным с CpG (TNT-266a), при этом сопоставимую активацию наблюдали для моноцитов. Слегка повышенную активацию DC-клеток наблюдали для TNT-266a по сравнению с TNT-363a.

#### **Пример 26: Активация В-клеток антителами к нектину-4.**

[0631] HT1376, OE19 и H292 клетки, экспрессирующие нектин-4 на уровне от высокого до среднего до низкого, соответственно, получали из ATCC и культивировали в соответствии с их протоколами. DLD-1 трансдуцировали для сверхэкспрессии нектин-4 и GFP и культивировали в соответствии с протоколами ATCC. Plateletpheresis Leukoreduction Chamber (LRS камера) получали от Vitalant и разбавляли PBS 1:3. Разбавленную кровь наслаивали в пробирке на 12 мл Ficoll-Paque. Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при  $400 \times g$ . PBMC собирали на границе раздела,

ресуспендировали и промывали в FACS буфере (PBS с 0,5% BSA). После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной RPMI1640 (RPMI1640+10% FBS). Опухолевые клетки (0,025Е6/лунка) метили CellTrace CFSE (ThermoFisher) и высевали в 96-луночный планшет в полной среде RPMI. К целевым клеткам добавляли трехкратные серийные разведения CpG-конъюгированных антител к нектину-4, от 300 нМ до 0,41 нМ, и инкубировали при 37°C в течение 20 минут. Свежевыделенные PBMC (0,5Е6/лунка) в полной RPMI добавляли в лунки при 20:1 (эффектор:мишень) и инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 18 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение пяти минут при 400 × g и окрашивали при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (ThermoFisher), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки промывали 1x FACS буфером и центрифугировали и окрашивали при 4°C в течение 30 минут в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD19 и анти-CD69 (ThermoFisher, Biolegend). Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (BD). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции. В-клетки идентифицировали как CD19<sup>+</sup> клетки и уровни активации В-клеток определяли по средней интенсивности флуоресценции.

[0632] Результаты показаны на Фиг. 31-32. Все CpG-конъюгированные антитела к нектину-4 показали активацию В-клеток по сравнению с отдельно используемым средством. TNT-266а имел более высокие уровни активации по сравнению сTNT-329а, TNT-350а, и TNT-351а в DLD-1, экспрессирующих нектин-4 (Фиг. 31). Интересно, что TNT-354а имел значительно более высокие уровни В-клеточной активации по сравнению сTNT-266а в DLD-1 клетках, экспрессирующих нектин-4, и эндогенных клеточных линиях (H292 и HT1376) (Фиг. 32). Наблюдаемая активация В-клеток вероятно происходит через активацию фоновых В-клеток и вторичного каскада.

**Пример 27: Вторичный иммунный ответ на конъюгаты антител к нектину-4.**

[0633] MC38 опухолевые клетки, экспрессирующие мышинный нектин-4 и GFP (MC38-нектин-4), получали путем ретровирусной трансдукции и нектин-4-экспрессирующие клетки отсортировывали и размножали. Клетки мышинной карциномы толстой кишки MC38-нектин-4 культивировали в полной DMEM (DMEM+Glutamax+10% FBS (Gibco)) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки отделяли с использованием трипсина 0,25% (Gibco) и промывали два раза средой DMEM (Gibco). Клетки ресуспендировали при 20Е6/мл в DMEM и хранили на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток подкожно имплантировали в правый бок 6-недельным самкам мышей C57BL/6 (Charles River). Размер опухоли измеряли и регистрировали два раза в неделю с использованием штангенциркуля, начиная с дня 4 после имплантации и до завершения испытания. Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле: (длина × ширина × ширина)/2. Когда средний размер опухолей достигал 60 мм<sup>3</sup>, примерно через 4 дня после имплантации,

мышей рандомизировали по размеру опухоли и начинали обработку. Были испытаны TNT-303а и TNT-304а. Конъюгаты вводили интраперитонеально 3 дозами с интервалом в 3 дня при 3 мг/кг. Через 100 дней после начальной элиминации опухоли 100 мкл суспендированных МС38-нектин-4 клеток (20Е6/мл) подкожно имплантировали в бок мышам С57BL/6 без опухоли и соответствующим им по возрасту контрольным мышам (Charles River). Мышей, у которых опухоли превышали 2000мм<sup>3</sup> или которые демонстрировали какие-либо признаки дистресса в любое время в период испытания, умерщвляли гуманным образом в соответствии с IACUC-одобренными протоколами по обращению с животными.

[0634] Результаты показаны на Фиг. 33. Оба испытанных конъюгата, TNT-303а и TNT-304а, приводили к устойчивому противоопухолевому вторичному иммунному ответу у мышей с устранением МС38-нектин-4.

#### **Пример 28: Противоопухолевая активность конъюгатов**

[0635] Клетки аденокарциномы SKBR3 культивировали в полной RPMI-1640 (RPMI-1640+Glutamax+10% FBS (Gibco)) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки отделяли с использованием трипсина 0,25% (Gibco) и промывали два раза RPMI-1640 (Gibco). После конечной промывки клетки ресуспендировали в смеси 1:1 матригель (Corning):RPMI-1640 при 50Е6/мл и хранили на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток подкожно имплантировали в правый бок иммунодефицитным 6-недельным самкам мышей nu/nu (Charles River). Размер опухоли измеряли и регистрировали два раза в неделю с использованием штангенциркуля, начиная с дня 6 после имплантации и до завершения испытания. Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле: (длина × ширина × ширина)/2. Когда средний размер опухолей достигал 86 мм<sup>3</sup>, примерно через 6 дней после имплантации, мышей рандомизировали по размеру опухоли и начинали обработку. Конъюгаты антител к нектину-4 в виде человеческого IgG1 (TNT-372а, TNT-373а, TNT-374а и TNT-375а) вводили интраперитонеально 3 дозами с интервалом в 3 дня при 3 мг/кг. Мышей, у которых опухоли превышали 2000мм<sup>3</sup> или которые демонстрировали какие-либо признаки дистресса в любое время в период испытания, умерщвляли гуманным образом в соответствии с IACUC-одобренными протоколами по обращению с животными. Результаты показаны на Фиг. 34. Системное введение конъюгатов антител к нектину-4 показало активность единого агента в модели SKBR3 иммунодефицитных мышей.

#### **Пример 29: Противоопухолевая активность в модели резистентности к ингибитору контрольной точки**

[0636] Опухолевые клетки СТ26, экспрессирующие мышинный нектин-4 (СТ26 нектин-4), получали путем ретровирусной трансдукции и клетки со средней и низкой экспрессией нектин-4 сортировали и размножали. Опухолевые клетки ЕМТ6, экспрессирующие мышинный нектин-4 (нектин-4 ЕМТ6), получали путем ретровирусной трансдукции и клетки со средней и низкой экспрессией нектин-4 сортировали и размножали. Клетки карциномы толстой кишки мыши СТ26-нектин-4 и клетки

карциномы молочной железы мыши EMT6-нектин-4 культивировали в полной RPMI-1640 (RPMI-1640+Glutamax+10% FBS (Gibco)) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки отделяли с использованием трипсина 0,25% (Gibco) и промывали два раза RPMI-1640 (Gibco). Клетки ресуспендировали при 20Е6/мл в RPMI-1640 и хранили на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток подкожно имплантировали в правый бок 6-недельным самкам мышей Balb/c (Charles River). Размер опухоли измеряли и регистрировали два раза в неделю с использованием штангенциркуля, начиная с дня 5 после имплантации для EMT6-нектин-4 и дня 7 после имплантации для СТ26-нектин-4. Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле: (длина × ширина × ширина)/2. Для EMT6 со средней и низкой экспрессией нектин-4, когда средний размер опухолей достигал 75 мм<sup>3</sup>, примерно через 5 дней после имплантации, мышей рандомизировали по размеру опухоли и начинали обработку. Для СТ26 со средней и низкой экспрессией нектин-4, когда средний размер опухолей достигал 84 мм<sup>3</sup> и 73 мм<sup>3</sup>, соответственно, мышей рандомизировали по размеру опухоли и начинали обработку. Конъюгаты вводили интраперитонеально 3 дозами с интервалом в 3 дня при 3 мг/кг. Мышей, у которых опухоли превышали 2000мм<sup>3</sup> или которые демонстрировали какие-либо признаки дистресса в любое время в период испытания, умерщвляли гуманным образом в соответствии с IACUC-одобренными протоколами по обращению с животными.

[0637] Системное введение конъюгатов показало активность единого агента в обеих мышинных моделях СТ26 и EMT6 со средней и низкой экспрессией нектин-4. Результаты показаны на Фиг. 35А (СТ26 модель) и Фиг. 35В (EMT6 модель; модель резистентности к ингибитору контрольной точки).

### **Пример 30: Противоопухолевая активность с усиленным Fc-доменом**

[0638] Опухолевые клетки СТ26, экспрессирующие мышинный нектин-4 (СТ26 нектин-4), получали путем ретровирусной трансдукции и клетки со средней и низкой экспрессией нектин-4 отсортировывали и размножали. Опухолевые клетки EMT6, экспрессирующие мышинный нектин-4 (EMT6 нектин-4), получали путем ретровирусной трансдукции и клетки со средней и низкой экспрессией нектин-4 отсортировывали и размножали. Клетки СТ26-нектин-4 мышинной карциномы толстой кишки и клетки EMT6-нектин-4 мышинной карциномы молочной железы культивировали в полной RPMI-1640 (RPMI-1640+Glutamax+10% FBS (Gibco)) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки отделяли с использованием трипсина 0,25% (Gibco) и промывали два раза RPMI-1640 (Gibco). Клетки ресуспендировали при 20Е6/мл в RPMI-1640 и хранили на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток подкожно имплантировали в правый бок 6-недельным самкам мышей Balb/c (Charles River). Размер опухоли измеряли и регистрировали два раза в неделю с использованием штангенциркуля, начиная с дня 5 после имплантации для EMT6-нектин-4 и с дня 7 после имплантации для СТ26-нектин-4. Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле: (длина × ширина × ширина)/2. Для EMT6 со средней и низкой экспрессией нектин-4, когда средний размер опухолей достигал 75 мм<sup>3</sup>, примерно через 5 дней после имплантации, мышей рандомизировали по размеру опухоли

и начинали обработку. Для СТ26 со средней и низкой экспрессией нектин-4, когда средний размер опухолей достигал 84 мм<sup>3</sup> и 73 мм<sup>3</sup> соответственно, мышей рандомизировали по размеру опухоли и начинали обработку. TNT348a и TNT303a вводили интраперитонеально 3 дозами с интервалом в 3 дня при 3 мг/кг. Мышей, у которых опухоли превышали 2000мм<sup>3</sup> или которые демонстрировали какие-либо признаки дистресса в любое время в период испытания, умерщвляли гуманным образом в соответствии с IACUC-одобренными протоколами по обращению с животными.

[0639] Результаты показаны на Фиг. 36А (СТ26 модель) и Фиг. 36В (ЕМТ6; модель резистентности к ингибитору контрольной точки). Конъюгат с усиленным Fc-доменом (имеющий более высокую аффинность к мышиным FcγR) (TNT-303a) показал сильную и более высокую активность по сравнению с конъюгатом с Fc-доменом, имеющим пониженную аффинность к мышиным FcγR (TNT-348a). Для TNT-303a, устранение опухоли наблюдали при 3 мг/кг у 5 из 5 мышей и у 2 из 5 мышей в моделях резистентных к ингибитору контрольной точки опухолей ЕМТ6 со средней экспрессией нектин-4 и ЕМТ6 с низкой экспрессией нектин-4, соответственно.

### **Пример 31: Сравнение DAR**

[0640] ЕМТ6 опухолевые клетки, экспрессирующие мышиный нектин-4 (ЕМТ6 нектин-4), получали путем ретровирусной трансдукции и клетки с низкой экспрессией нектин-4 отсортировывали и размножали. Клетки ЕМТ6-нектин-4 мышинной карциномы молочной железы культивировали в полной RPMI-1640 (RPMI-1640+Glutamax+10% FBS (Gibco)) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки отделяли с использованием трипсина 0,25% (Gibco) и промывали два раза RPMI-1640 (Gibco). Клетки ресуспендировали при 20Е6/мл в RPMI-1640 и хранили на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток подкожно имплантировали в правый бок 6-недельным самкам Balb/C мышей (Charles River). Размер опухоли измеряли и регистрировали два раза в неделю с использованием штангенциркуля, начиная с дня 5 после имплантации для ЕМТ6-нектин-4. Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле: (длина × ширина × ширина)/2. Для ЕМТ6 с низкой экспрессией нектин-4, когда средний размер опухолей достигал 75 мм<sup>3</sup>, примерно через 5 дней после имплантации, мышей рандомизировали по размеру опухоли и начинали обработку. Конъюгат антитело к нектину-4-СрG с соотношением СрG:антитело 1:1 (TNT-372a) или с соотношением СрG:антитело 2:1 (TNT-377b) вводили интраперитонеально 3 дозами с интервалом в 3 дня при 3 мг/кг. Мышей, у которых опухоли превышали 2000мм<sup>3</sup> или которые демонстрировали какие-либо признаки дистресса в любое время в период испытания, умерщвляли гуманным образом в соответствии с IACUC-одобренными протоколами по обращению с животными. Результаты показаны на Фиг. 37. Конъюгат с соотношением 2:1 показал меньшую эффективность по сравнению с конъюгатом с соотношением 1:1.

### **Пример 32: Активность нефукозилированного конъюгата в клеточных линиях с высокой и низкой экспрессией нектин-4**

[0641] Клеточную линию HT1376 рака мочевого пузыря с высокой экспрессией

нектина-4 или клеточную линию H292 рака легких с низкой экспрессией нектина-4 метили 300 нМ CellTrace CFSE (ThermoFisher) и сразу же высевали в 96-луночный планшет (0,025Е6/луночка). Камеры для снижения уровня лейкоцитов получали от Vitalant и разбавляли 1:3 фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco). Разбавленную кровь наслаивали в пробирке на 12 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при  $400 \times g$ . PBMC собирали на границе раздела, ресуспендировали и промывали в FACS буфере (PBS с 0,5% бычьим сывороточным альбумином, Gibco). После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной RPMI-1640 (RPMI-1640+10% FBS, Gibco). PBMC сразу же добавляли к посеянным опухолевым клеткам при 20:1 (эффлектор:мишень). 300 нМ нефукозилированного нектин-4 CpG конъюгата (TNT-385a) или фукозилированного нектин-4 CpG конъюгата (TNT-354a) или соответствующих неконъюгированных антител в качестве контролей добавляли в лунки при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 18 часов. Клетки диссоциировали при помощи TrypLE (ThermoFisher), промывали и осаждали центрифугированием в течение пяти минут при  $400 \times g$  перед окрашиванием в течение 60 минут при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенном 1:5000 в PBS. Клетки промывали и центрифугировали и окрашивали в течение 60 минут при 4°C в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD14, анти-CD11c, анти-CD3, анти-CD20, анти-CD56, анти-CD16, анти-HLADR, анти-CD69 и анти-CD86 (ThermoFisher, Biolegend). Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (BD). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции. В-клетки идентифицировали как CD20<sup>+</sup> клетки. Моноциты идентифицировали как CD20<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> клетки. DC идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>HLADR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> клетки. Уровни активации определяли по средней интенсивности флуоресценции (MFI) и фагоцитоз измеряли как % CFSE-положительных моноцитов. Результаты показаны на Фиг. 38; данные активации и фагоцитоза показаны на графике как кратное изменение активности нектин-4-CpG конъюгата по сравнению с соответствующим антителом к нектину-4 (неконъюгированным). Нефукозилированный нектин-4-CpG конъюгат (TNT-385a) показал более высокую активацию (В-клеток, моноцитов и DC) и фагоцитоз по сравнению с соответствующим фукозилированным нектин-4-CpG конъюгатом (TNT-354a) при связывании с нектин-4-положительными опухолевыми клетками как с высоким, так и с низким уровнем экспрессии.

**Пример 33: Активность варианта Fc в клеточных линиях с высокой и низкой экспрессией нектина-4**

[0642] Клеточную линию HT1376 рака мочевого пузыря с высокой экспрессией нектина-4 или клеточную линию H292 рака легких с низкой экспрессией нектина-4 метили 300 нМ CellTrace CFSE (ThermoFisher) и сразу же высевали в 96-луночный

планшет (0,025E6/лунка). Камеры для снижения уровня лейкоцитов получали от Vitalant и разбавляли 1:3 фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco). Разбавленную кровь наслаивали в пробирке на 12 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при  $400 \times g$ . PBMC собирали на границе раздела, ресуспендировали и промывали в FACS буфере (PBS с 0,5% бычьим сывороточным альбумином, Gibco). После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной RPMI-1640 (RPMI-1640+10% FBS, Gibco). PBMC сразу же добавляли к посеянным опухолевым клеткам при 20:1 (эффе́ктор:мишень). К клеткам добавляли четырехкратные серийные разведения, от 1 мкМ до 0,2 нМ, фукозилированного конъюгата человеческого IgG1 нектин-4 CpG (TNT-415a), фукозилированного человеческого IgG1 с мутацией G236A (TNT-416a) или соответствующих нефукозилированных конъюгатов нектин-4 CpG (TNT-415a-AF, TNT-416a-AF) вместе с их соответствующими антителами, используемыми отдельно в качестве контролей. После 18-час инкубации при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> клетки о при помощи TrupLE (ThermoFisher), промывали и осаждали центрифугированием в течение пяти минут при  $400 \times g$  перед окрашиванием в течение 30 минут при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разбавленном 1:5000 в PBS. Клетки промывали и центрифугировали и окрашивали в течение 60 минут при 4°C в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD14, анти-CD11c, анти-CD3, анти-CD20, анти-CD56, анти-CD16, анти-HLADR, анти-CD69 и анти-CD86 (ThermoFisher, Biolegend). Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (BD). Мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции. В-клетки идентифицировали как CD20<sup>+</sup> клетки. Моноциты идентифицировали как CD20<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> клетки. DC идентифицировали как CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>HLADR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> клетки. Количество клеток определялось по событиям, собранным в пределах установленного объема сбора данных.

[0643] Пролиферацию дендритных клеток (DC) наблюдали со всеми конъюгатами. Содержащий Fc с G236A-мутацией конъюгат Нектин-4 CpG (фукозилированный и нефукозилированный) приводил к более высоким уровням пролиферации DC по сравнению с соответствующими конъюгатами с немутированным Fc. Не наблюдали никакой разницы в активности в моноцитах, NK-клетках, Т-клетках и В-клетках. Результаты для пролиферации DC в HT1376 и H292 показаны на Фиг. 39 как кратное изменение активности конъюгата нектин-4 CpG по сравнению с соответствующим антителом к нектину-4, используемым в качестве контроля.

#### **Пример 34: Уничтожающая опухоль активность**

[0644] Клеточную линию рака легких H292 с низкой экспрессией нектин-4 и клеточную линию рака предстательной железы PC3 с очень низкой экспрессией нектин-4 метили 300 нМ CellTrace CFSE (ThermoFisher) и сразу же высевали в 96-луночный планшет (0,025E6/лунка). Камеры для снижения уровня лейкоцитов получали от Vitalant и

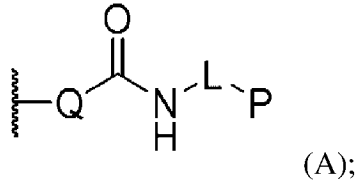
разбавляли 1:3 фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco). Разбавленную кровь наслаивали в пробирке на 12 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при  $400 \times g$ . PBMC собирали на границе раздела, ресуспендировали и промывали в FACS буфере (PBS с 0,5% бычьим сывороточным альбумином, Gibco). После одной промывки PBMC ресуспендировали в полной RPMI-1640 (RPMI-1640+10% FBS, Gibco). PBMC сразу же добавляли к посеянным опухолевым клеткам при 20:1 (эффе́ктор:мишень). К клеткам добавляли четырехкратные серийные разведения, от 1 мкМ до 0,2 нМ, фукозилированного конъюгата человеческого IgG1 нектин-4-CpG (TNT-415a), фукозилированного человеческого IgG1 с мутацией G236A (TNT-416a) или соответствующих нефукозилированных конъюгатов нектин-4-CpG (TNT-415a-AF, TNT-416a-AF) вместе с их соответствующими антителами, используемыми отдельно в качестве контролей (не конъюгированы с CpG). После 18-час инкубации при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> клетки отделяли при помощи TrypLE (ThermoFisher), промывали и осаждали центрифугированием в течение пяти минут при  $400 \times g$  перед окрашиванием в течение 30 минут при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенном 1:5000 в PBS. Клетки промывали и центрифугировали и окрашивали в течение 60 минут при 4°C в FACS буфере, содержащем блокирующий FcR реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD14, анти-CD11c, анти-CD3, анти-CD20, анти-CD56, анти-CD16, анти-HLADR, анти-CD69 и анти-CD86 (ThermoFisher, Biolegend). Клетки центрифугировали и промывали два раза в FACS буфере и фиксировали в 0,5% параформальдегиде. Клетки получали в установленном объеме для сбора данных на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher), с последующим анализом данных с использованием программного обеспечения Flowjo 10.7 (BD). Целевые раковые клетки идентифицировали по CFSE+ популяции с высоким уровнем FFC и высоким уровнем SSC. Из целевой клеточной популяции мертвые клетки исключали путем гейтирования по eFluor 780-отрицательной популяции и идентифицировали как % живых клеток от целевых раковых клеток. Данные представляли в виде графика как кратное изменение при использовании нектин-4 CpG конъюгатов по сравнению с контролем, их соответствующим антителом к нектину-4.

[0645] Цитотоксичность для опухолевых клеток наблюдали со всеми конъюгатами. Результаты, касающиеся жизнеспособности раковых клеток, показаны на Фиг. 40 как кратное повышение активности нектин-4 CpG конъюгата по сравнению с соответствующим антителом к нектину-4 в качестве контроля.



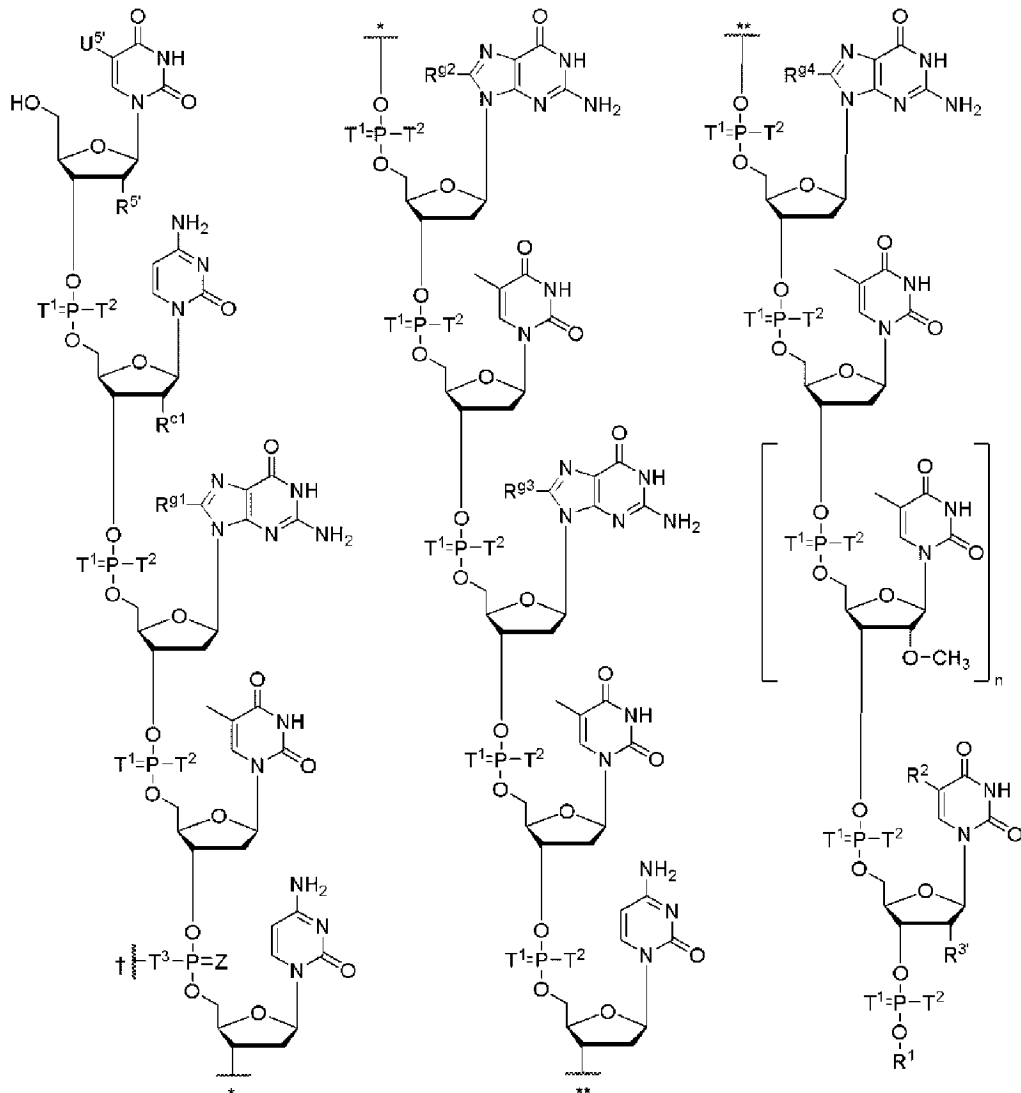
### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), включающими по меньшей мере один глутаминовый остаток, и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A):



где  $\sim$  указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

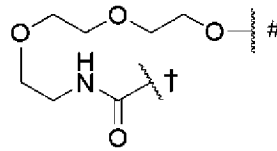
где каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, включающий структуру



где  $\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где  $\sim^\dagger$  указывает точку присоединения к линкеру L;

каждый  $T^1$  независимо представляет собой O или S;

каждый  $T^2$  представляет собой S<sup>-</sup>;



$T^3$  представляет собой группу  $\text{---}^\dagger$ , где  $\sim^\dagger$  указывает точку присоединения к L, и где  $\sim^\#$  указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$  представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{c1}$  представляет собой -H или метокси;

$R^{g1}$ ,  $R^{g2}$ ,  $R^{g3}$  и  $R^{g4}$  представляют собой H;

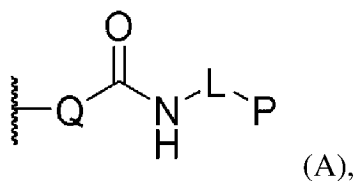
$R^{3'}$  представляет собой метокси;

$R^1$  представляет собой  $-(CH_2)_3-OH$ ;

$R^2$  представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

2. Конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)

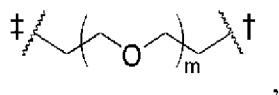


где:

$\sim$  указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

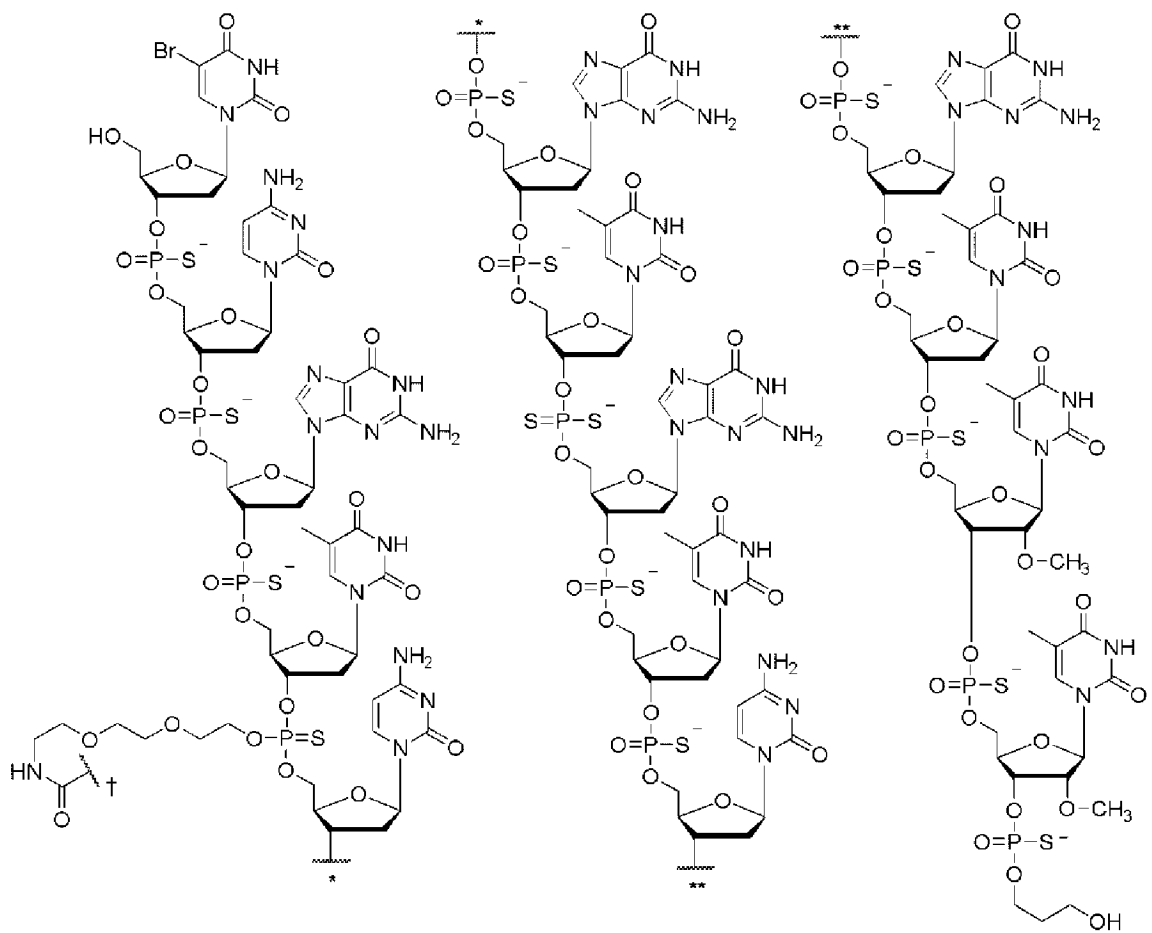
каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



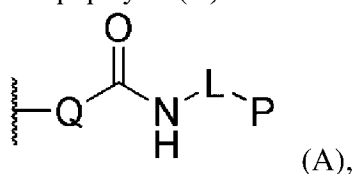
где  $m$  представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где  $\sim\sim\sim\ddagger$  указывает точку присоединения к Р, и  $\sim\sim\sim\ddagger$  указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый Р независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



где  $\sim\sim\sim^*$  и  $\sim\sim\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где  $\sim\sim\sim\ddagger$  указывает точку присоединения к линкеру L.

3. Конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)

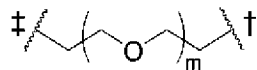


где:

~~~~~ указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

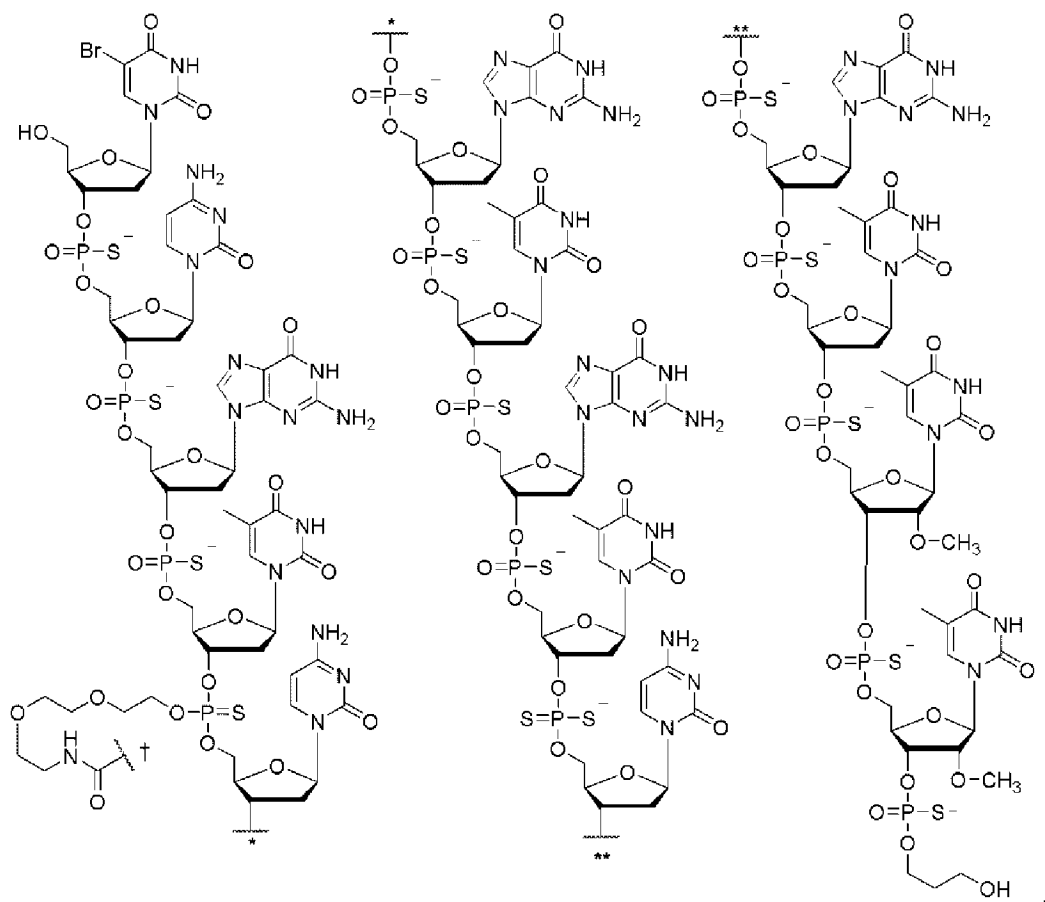
каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



где m представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где ~~~~† указывает точку присоединения к P, и ~~~~‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, включающий структуру



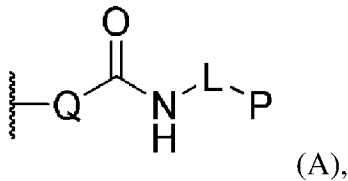
где ~~~~\* и ~~~~\*\* указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где ~~~~† указывает точку присоединения к линкеру L.

4. Конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P),

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), которые включают аминокислотную

последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47),

и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид (P) связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A):



где  $\sim$  указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab).

5. Конъюгат, включающий антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело включает две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два Q-tag пептида, каждый из которых включает пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47); где каждый из Q-tag пептидов связан с С-концом одной из тяжелых цепей антитела; и где по меньшей мере один из Q-tag пептидов связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом (P) через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано на Фиг. 9А или Фиг. 9В.

6. Конъюгат, включающий антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab), по меньшей мере одну пептидную последовательность Q-tag, включающую глутаминовый остаток, и по меньшей мере один иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где пептидная последовательность Q-tag является природной или синтетической, и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag через амидную связь с глутаминовым остатком и линкер (L), где по меньшей мере одна пептидная последовательность Q-tag выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:39-55.

7. Конъюгат по любому из пп. 1-6, где антитело включает домен, представляющий собой вариабельную область легкой цепи (VL), и домен, представляющий собой вариабельную область тяжелой цепи (VH), где:

(a) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942 и 944, и VH-домен включает последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943 и 945;

(b) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:248, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:249;

(c) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:250, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена





домена SEQ ID NO:932., и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:933;

(ee) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:934, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:935;

(ff) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:936, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:937;

(gg) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:938, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:939;

(hh) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:940, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:941;

(ii) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:942, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:943; или

(jj) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:944, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:945.

8. Конъюгат по любому из пп. 1-7, где антитело включает домен, представляющий собой переменную область тяжелой цепи (VH), и домен, представляющий собой переменную область легкой цепи (VL), где:

(a) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:275, CDR-H2 включает SEQ ID NO:276, CDR-H3 включает SEQ ID NO:277, CDR-L1 включает SEQ ID NO:272, CDR-L2 включает SEQ ID NO:273 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:274;

(b) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:293, CDR-H2 включает SEQ ID NO:294, CDR-H3 включает SEQ ID NO:295, CDR-L1 включает SEQ ID NO:290, CDR-L2 включает SEQ ID NO:291 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:292;

(c) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:311, CDR-H2 включает SEQ ID NO:312, CDR-H3 включает SEQ ID NO:313, CDR-L1 включает SEQ ID NO:308, CDR-L2 включает SEQ ID NO:309 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:310;

(d) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:329, CDR-H2 включает SEQ ID NO:330, CDR-H3 включает SEQ ID NO:331, CDR-L1 включает SEQ ID NO:326, CDR-L2 включает SEQ ID NO:327 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:328;

(e) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-



L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:347, CDR-H2 включает SEQ ID NO:348, CDR-H3 включает SEQ ID NO:349, CDR-L1 включает SEQ ID NO:344, CDR-L2 включает SEQ ID NO:345 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:346;

(f) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:365, CDR-H2 включает SEQ ID NO:366, CDR-H3 включает SEQ ID NO:367, CDR-L1 включает SEQ ID NO:362, CDR-L2 включает SEQ ID NO:363 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:364;

(g) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:383, CDR-H2 включает SEQ ID NO:384, CDR-H3 включает SEQ ID NO:385, CDR-L1 включает SEQ ID NO:380, CDR-L2 включает SEQ ID NO:381 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:382;

(h) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:401, CDR-H2 включает SEQ ID NO:402, CDR-H3 включает SEQ ID NO:403, CDR-L1 включает SEQ ID NO:398, CDR-L2 включает SEQ ID NO:399 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:400;

(i) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:419, CDR-H2 включает SEQ ID NO:420, CDR-H3 включает SEQ ID NO:421, CDR-L1 включает SEQ ID NO:416, CDR-L2 включает SEQ ID NO:417 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:418;

(j) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:437, CDR-H2 включает SEQ ID NO:438, CDR-H3 включает SEQ ID NO:439, CDR-L1 включает SEQ ID NO:434, CDR-L2 включает SEQ ID NO:435 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:436;

(k) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:455, CDR-H2 включает SEQ ID NO:456, CDR-H3 включает SEQ ID NO:457, CDR-L1 включает SEQ ID NO:452, CDR-L2 включает SEQ ID NO:453 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:454;

(l) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:281, CDR-H2 включает SEQ ID NO:282, CDR-H3 включает SEQ ID NO:283, CDR-L1 включает SEQ ID NO:278, CDR-L2 включает SEQ ID NO:279 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:280;

(m) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:299, CDR-H2 включает SEQ ID NO:300, CDR-H3 включает SEQ ID NO:301, CDR-L1 включает SEQ ID NO:296, CDR-L2 включает SEQ ID NO:297 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:298;

(n) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:317, CDR-H2 включает SEQ ID NO:318, CDR-H3 включает SEQ ID NO:319, CDR-L1 включает SEQ ID NO:314, CDR-L2 включает SEQ ID NO:315 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:316;

(o) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-





L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:485, CDR-H2 включает SEQ ID NO:486, CDR-H3 включает SEQ ID NO:487, CDR-L1 включает SEQ ID NO:482, CDR-L2 включает SEQ ID NO:483 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:484;

(jj) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:473, CDR-H2 включает SEQ ID NO:474, CDR-H3 включает SEQ ID NO:475, CDR-L1 включает SEQ ID NO:470, CDR-L2 включает SEQ ID NO:471 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:472;

(kk) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:562, CDR-L2 включает SEQ ID NO:563 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:564, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:565, CDR-H2 включает SEQ ID NO:566 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:567;

(ll) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:580, CDR-L2 включает SEQ ID NO:581 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:582, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:583, CDR-H2 включает SEQ ID NO:584 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:585;

(mm) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:598, CDR-L2 включает SEQ ID NO:599 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:600, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:601, CDR-H2 включает SEQ ID NO:602 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:603;

(nn) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:616, CDR-L2 включает SEQ ID NO:617 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:618, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:619, CDR-H2 включает SEQ ID NO:620 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:621;

(oo) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:634, CDR-L2 включает SEQ ID NO:635 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:636, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:637, CDR-H2 включает SEQ ID NO:638 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:639;

(pp) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:652, CDR-L2 включает SEQ ID NO:653 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:654, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:655, CDR-H2 включает SEQ ID NO:656 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:657;

(qq) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:670, CDR-L2 включает SEQ ID NO:671 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:672, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:673, CDR-H2 включает SEQ ID NO:674 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:675;

(rr) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:688, CDR-L2 включает SEQ ID NO:689 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:690, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:691, CDR-H2 включает SEQ ID NO:692 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:693;

(ss) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-

H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:706, CDR-L2 включает SEQ ID NO:707 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:708, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:709, CDR-H2 включает SEQ ID NO:710 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:711;

(tt) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:724, CDR-L2 включает SEQ ID NO:725 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:726, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:727, CDR-H2 включает SEQ ID NO:728 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:729;

(uu) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:742, CDR-L2 включает SEQ ID NO:743 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:744, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:745, CDR-H2 включает SEQ ID NO:746 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:747;

(vv) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:760, CDR-L2 включает SEQ ID NO:761 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:762, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:763, CDR-H2 включает SEQ ID NO:764 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:765;

(ww) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:778, CDR-L2 включает SEQ ID NO:779 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:780, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:781, CDR-H2 включает SEQ ID NO:782 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:783;

(xx) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:796, CDR-L2 включает SEQ ID NO:797 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:798, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:799, CDR-H2 включает SEQ ID NO:800 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:801;

(yy) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:814, CDR-L2 включает SEQ ID NO:815 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:816, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:817, CDR-H2 включает SEQ ID NO:818 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:819; или

(zz) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:832, CDR-L2 включает SEQ ID NO:833 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:834, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:835, CDR-H2 включает SEQ ID NO:836 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:837.

9. Конъюгат по любому из пп. 1-8, где антитело включает домен, представляющий собой переменную область легкой цепи (VL), и домен, представляющий собой переменную область тяжелой цепи (VH), где:

(а) VH-домен включает последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943 и 945, и/или VL-домен включает последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936,



включает последовательность SEQ ID NO:915;

(v) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:916 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:917;

(w) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:918 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:919;

(x) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:920 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:921;

(y) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:922 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:923;

(z) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:924 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:925;

(aa) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:926 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:927;

(bb) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:928 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:929;

(cc) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:930 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:931;

(dd) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:932 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:933;

(ee) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:934 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:935;

(ff) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:936 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:937;

(gg) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:938 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:939;

(hh) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:940 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:941;

(ii) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:942 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:943; или

(jj) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:944 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:945.

10. Конъюгат по любому из пп. 1-9, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

11. Конъюгат по любому из пп. 1-10, где антитело представляет собой Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab'-SH, Fv, scFv, однодоменное, содержащее только одну тяжелую цепь или содержащее только одну легкую цепь антитело или фрагмент антитела.

12. Конъюгат по любому из пп. 1-11, где антитело представляет собой гуманизированное, человеческое или химерное антитело, или его фрагмент.

13. Конъюгат по любому из пп. 1-12, где антитело включает Fc-область.

14. Конъюгат по п. 13, где Fc-область представляет собой человеческую Fc-

область, выбранную из группы, состоящей из Fc-области IgG1, Fc-области IgG2 и Fc-области IgG4.

15. Конъюгат по п. 13 или п. 14, где Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые уменьшают связывание с C1q.

16. Конъюгат по п. 13 или п. 14, где Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые повышают связывание с C1q.

17. Конъюгат по п. 13 или п. 14, где Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, демонстрирующую активность дикого типа, связанную с активацией комплемента.

18. Конъюгат по п. 13 или п. 14, где Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые повышают активацию комплемента.

19. Конъюгат по п. 13 или п. 14, где Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают эффекторную функцию по сравнению с человеческой Fc-областью, которая не содержит аминокислотную замену(замены).

20. Конъюгат по п. 13-14 или п. 19, где Fc-область представляет собой:

(a) Fc-область IgG1 человека, включающую замены L234A, L235A и/или G237A, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом;

(b) Fc-область IgG2 человека, включающую замены A330S и/или P331S, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом; или

(c) Fc-область IgG4 человека, включающую замены S228P и/или L235E, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом.

21. Конъюгат по п. 13 или п. 14, где Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1 дикого типа.

22. Конъюгат по п. 13 или п. 14, где Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1.

23. Конъюгат по п. 13, 14 или 22, где Fc-область сконструирована так, чтобы улучшить эффекторную функцию, при этом необязательно улучшенная эффекторная функция представляет собой антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC активность), антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP активность) или комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC активность).

24. Конъюгат по п. 23, где Fc-область сконструирована как обладающая по меньшей мере двумя характерными свойствами, выбранными из группы, состоящей из улучшенной ADCC активности, улучшенной ADCP активности и улучшенной CDC активности.

25. Конъюгат по п. 23 или п. 24, где Fc-область включает замену G236A, где аминокислотное положение указано в соответствии с EU-индексом.



26. Конъюгат по п. 23 или п. 24, где Fc-область включает замену G236A, где аминокислотное положение указано в соответствии с EU-индексом, и Fc-область является нефукозилированной.

27. Конъюгат по любому из пп. 23-26, где Fc-область сконструирована для улучшения ADCC активности.

28. Конъюгат по любому из пп. 23-27, где Fc-область сконструирована так, чтобы улучшить ADCP активность.

29. Конъюгат по любому из пп. 23-28, где Fc-область сконструирована так, чтобы улучшить CDC активность.

30. Конъюгат по любому из пп. 23-29, где антитело включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает ADCC активность.

31. Конъюгат по любому из пп. 23-30, где антитело включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает ADCP активность.

32. Конъюгат по любому из пп. 23-31, где антитело включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает CDC активность.

33. Конъюгат по любому из пп. 23-32, где по меньшей мере одна или по меньшей мере две из тяжелых цепей антитела является/являются нефукозилированными.

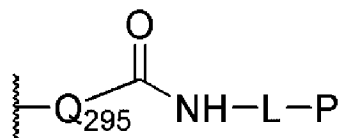
34. Конъюгат по п. 33, где антитело получают в клеточной линии с нокаутом альфа1,6-фукозилтрансферазы (Fut8) или в клеточной линии, сверхэкспрессирующей  $\beta$ 1,4-N-ацетилгликозаминилтрансферазу III (GnT-III), при этом клеточная линия необязательно представляет собой клеточную линию CHO.

35. Конъюгат по п. 33 или п. 34, где антитело получают в системе экспрессии в присутствии соединения 2-фторфукозы или производного 5-алкинилфукозы.

36. Конъюгат по любому из пп. 33-35, где клеточная линия сверхэкспрессирует  $\mu$ -маннозидазу Гольджи II (ManII), при этом клеточная линия необязательно представляет собой клеточную линию CHO.

37. Конъюгат по любому из пп. 13-36, где Fc-область включает замену N297A, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом.

38. Конъюгат по любому из пп. 13-37, где конъюгат также включает иммуномодулирующий олигонуклеотид P, присоединенный к Q295 остатка Fc-области,



как показано в следующей формуле , где L представляет собой линкерную группу, связанную с Q295 Fc-области через амидную связь.

39. Конъюгат по любому из пп. 1-38, где антитело включает константный домен тяжелой цепи антитела, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:92-107, 111,112, 178 и 494-497.

40. Конъюгат по любому из пп. 1-39, где антитело включает человеческую легкую

цепь лямбда.

41. Конъюгат по любому из пп. 1-39, где антитело включает человеческую легкую цепь каппа.

42. Конъюгат по любому из пп. 1-41, где антитело включает константный домен легкой цепи антитела, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:108-110.

43. Конъюгат по любому из пп. 1-4 и 6-42, где антитело включает две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, и где один Q-tag присоединен к одной или обоим тяжелым цепям антитела.

44. Конъюгат по п. 43, где Q-tag слит с C-концом тяжелой цепи антитела(антител).

45. Конъюгат по любому из пп. 1-4 и 6-43, где антитело включает две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, и где один Q-tag присоединен к одной или обоим легким цепям антитела.

46. Конъюгат по любому из пп. 1-4 и 6-43, где Q-tag находится в Fc-домене.

47. Конъюгат по любому из пп. 1-46, где конъюгат индуцирует активацию TLR9.

48. Конъюгат по любому из пп. 1-47, где каждый Q-tag независимо включает пептидную последовательность, включающую от 5 до 15 аминокислотных остатков.

49. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-48, где Q-tag имеет природное происхождение.

50. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-48, где пептидная последовательность каждого Q-tag независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-55.

51. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-48, где Q-tag включает пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47).

52. Конъюгат по любому из пп. 1-48, где каждый Q-tag независимо включает RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQGFPP (SEQ ID NO:48) или RPQGFPP (SEQ ID NO:49).

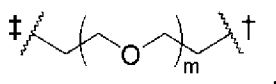
53. Конъюгат по любому из пп. 1-48, где каждый Q-tag независимо включает RPQGFPP (SEQ ID NO:49).

54. Конъюгат по любому из пп. 1-53, где 1 или 2 Q-tag связан/связаны с антителом.

55. Конъюгат по любому из пп. 1-54, где конъюгат имеет значение DAR, равное 1 или 2.

56. Конъюгат по любому из пп. 1 и 4-55, где линкер L включает полиэтиленгликолевый фрагмент.

57. Конъюгат по любому из пп. 1 и 4-56, где линкер L представляет собой



где  $m$  представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где  $\sim \dagger$  указывает точку присоединения к  $T^3$ , и  $\sim \dagger^+$  указывает точку присоединения к остальной части конъюгата.

58. Конъюгат по п. 57, где  $m$  имеет значение от около 20 до около 30.

59. Конъюгат по п. 57 или п. 58, где  $m$  имеет значение около 24.
60. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-59, где  $Z$  представляет собой  $S$ .
61. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-59, где олигонуклеотид  $P$  включает по меньшей мере одну пару геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S^-$ .
62. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 1.
63. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 2.
64. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 3.
65. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 5.
66. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 6.
67. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 7.
68. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 8.
69. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 9.
70. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 10.
71. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 11.
72. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 12.
73. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой  $S$  и  $T^2$  представляет собой  $S$ , находится в 3'-положении нуклеозидного

остатка 13.

74. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 14.

75. Конъюгат по п. 61, где по меньшей мере одна пара геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S, находится в 3'-положении нуклеозидного остатка 15.

76. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-75, где олигонуклеотид Р включает по меньшей мере две пары геминальных  $T^1$  и  $T^2$ , где  $T^1$  представляет собой S и  $T^2$  представляет собой S<sup>-</sup>.

77. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-76, где  $R^{5'}$  представляет собой Н.

78. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-76, где  $R^{5'}$  представляет собой метокси.

79. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-76, где  $R^{c1}$  представляет собой Н.

80. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-76, где  $R^{c1}$  представляет собой метокси.

81. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-80, где  $R^2$  представляет собой метил.

82. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-80, где  $R^2$  представляет собой Н.

83. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-82, где  $U^{5'}$  представляет собой бром.

84. Конъюгат по любому из пп. 1 и 7-82, где  $U^{5'}$  представляет собой -Н.

85. Конъюгат по любому из пп. 2-3 и 7-84, где m представляет собой целое число от 20 до 25.

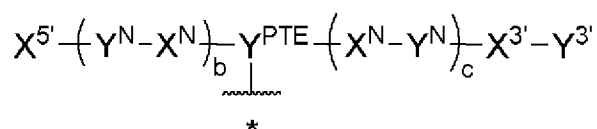
86. Конъюгат по п. 85, где m имеет значение 24.

87. Конъюгат по любому из пп. 1 и 4-56, где каждый Р независимо включает олигонуклеотид, выбранный из Таблицы 2, Таблицы 3 и Таблицы 4.

88. Конъюгат по любому из пп. 1 и 4-56, где каждый (L) и (P) в конъюгате независимо включает структуру, выбранную из Таблицы 2, Таблицы 5 и Таблицы 6, необязательно соединение 7.6b или соединение 7.7b.

89. Конъюгат по любому из пп. 1 и 4-56, где каждый (P) и (L) в конъюгате независимо включает олигонуклеотид или модифицированный олигонуклеотид, выбранный из SEQ ID NOS: 1-38 и 129-166.

90. Конъюгат по любому из пп. 4-56, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид Р независимо представляет собой

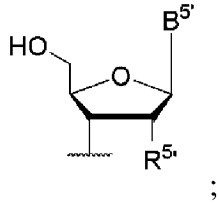


где

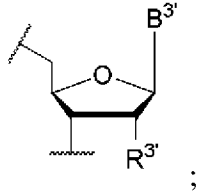
b и c каждый независимо представляет собой целое число от 1 до 25; при условии, что сумма b и c равна по меньшей мере 5;

~~~~~\* указывает точку присоединения иммуномодулирующего олигонуклеотида Р к остальной части конъюгата;

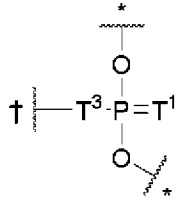
$X^{5'}$  представляет собой 5'-концевой нуклеозид, включающий структуру

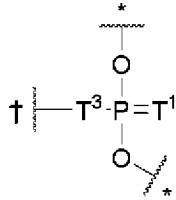




$X^{3'}$  представляет собой 3'-концевой нуклеозид, включающий структуру

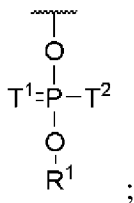


$Y^{PTE}$  представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир, включающий

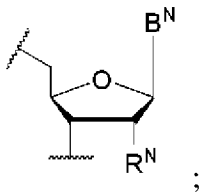


структуру , где \* указывает точки присоединения к остальной части олигонуклеотида и  † указывает точку присоединения к линкеру L, или, если L отсутствует,  † указывает точку присоединения к Q-tag пептиду на глутаминовом остатке через амидную связь;

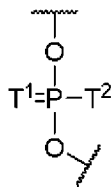
$Y^3$  представляет собой концевой фосфотриэфир, включающий структуру



каждый  $X^N$  независимо представляет собой нуклеозид, включающий структуру



каждый  $Y^N$  независимо представляет собой межнуклеозидный линкер,



включающий структуру  ;

где каждый  $B^N$  независимо представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеоснование;

каждый  $R^N$  независимо представляет собой -H или -O-C<sub>1-4</sub>-алкил, где C<sub>1-4</sub>-алкил из -O-C<sub>1-4</sub>-алкила необязательно дополнительно замещен -O-C<sub>1-4</sub>-алкилом;

$B^{5'}$  и  $B^{3'}$  независимо представляют собой модифицированное или немодифицированное нуклеоснование;

$R^{5'}$  и  $R^{3'}$  независимо представляют собой -H или -O-C<sub>1-4</sub>-алкил, где C<sub>1-4</sub>-алкил из -O-C<sub>1-4</sub>-алкила необязательно дополнительно замещен -O-C<sub>1-4</sub>-алкилом;

каждый T<sub>1</sub> независимо представляет собой O или S;

каждый T<sub>2</sub> независимо представляет собой O<sup>-</sup> или S<sup>-</sup>; и

T<sub>3</sub> представляет собой группу, включающую олигоэтиленгликолевый фрагмент; и

R<sup>1</sup> представляет собой C<sub>1-4</sub>-алкилен-гидрокси.

91. Конъюгат по п. 90, где b имеет значение 3.

92. Конъюгат по п. 90 или п. 91, где:

(i) P включает по меньшей мере один модифицированный нуклеозид X<sup>N</sup>;

(ii) P имеет по меньшей мере один модифицированный межнуклеозидный линкер Y<sup>N</sup>, где по меньшей мере один из T<sup>1</sup> или T<sup>2</sup> представляет собой S; или

(iii) как (i), так и (ii).

93. Конъюгат по любому из пп. 90-92, где P содержит по меньшей мере один фосфородитионатный или фосфоротионатный межнуклеозидный линкер.

94. Конъюгат по любому из пп. 90-93, где P включает 0, 1, 2 или 3 фосфородитионатных межнуклеозидных линкера.

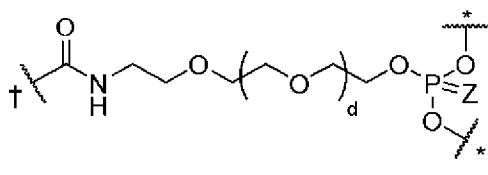
95. Конъюгат по любому из пп. 90-94, где P включает модифицированный нуклеозид, выбранный из группы, состоящей из 2'-O-алкилнуклеозида, 2'-O-алкоксиалкилнуклеозида, 2'-дезоксинуклеозида и рибонуклеозида.

96. Конъюгат по п. 95, где модифицированный нуклеозид выбран из группы, состоящей из 5-бром-2'-O-метилуридина, 5-бром-2'-дезоксинуридина, 2'-O-метилуридина, 2'-дезоксинуридина, 2'-O-метилтимидина, 2'-O-метилцитидина, 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидина и 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина.

97. Конъюгат по любому из пп. 90-96, где X<sup>5'</sup> представляет собой 5-бром-2'-O-метилуридин, 5-бром-2'-дезоксинуридин, 2'-O-метилуридин или 2'-дезоксинуридин.

98. Конъюгат по любому из пп. 90-97, где Y<sup>3'</sup> или Y<sup>N</sup> в 3'-положении X<sup>5'</sup> включает незамещенный или замещенный фосфоротионат.

99. Конъюгат по любому из пп. 90-98, где Y<sup>PTE</sup> представляет собой :

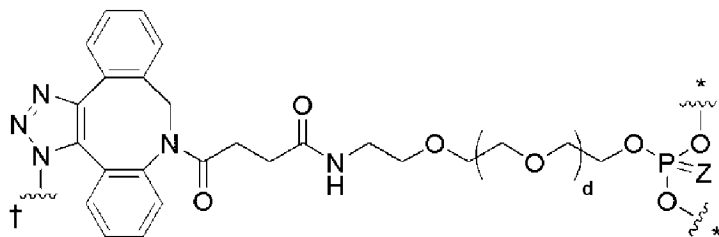


где Z представляет собой O или S; d представляет собой целое число от 0 до 95; два

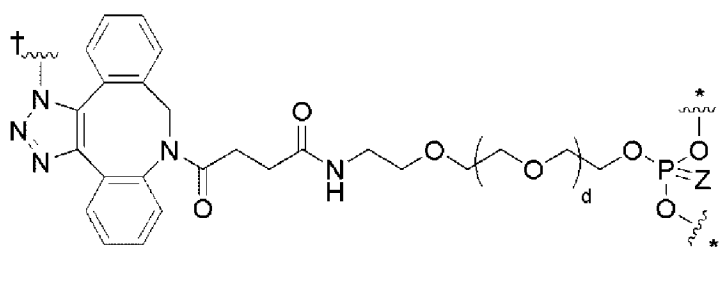
~~~~\* на правой стороне структуры указывают точки присоединения к смежным

нуклеозидом  $X^N$  в олигонуклеотиде P, и  $\sim \dagger$  на левой стороне структуры указывает точку присоединения к линкеру L.

100. Конъюгат по любому из пп. 90-98, где  $Y^{PTE}$  представляет собой :



или



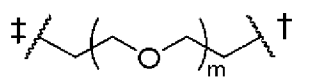
где Z представляет собой O или S; d представляет собой целое число от 0 до 95; два  $\sim *$  на правой стороне структуры указывают точки присоединения к смежным нуклеозидом  $X^N$  в олигонуклеотиде P, и один  $\sim \dagger$  на левой стороне структуры указывает точку присоединения к линкеру L.

101. Конъюгат по п. 99 или 100, где Z представляет собой S.

102. Конъюгат по любому из пп. 99-101, где d представляет собой целое число от 1 до 25.

103. Конъюгат по любому из пп. 90-102, где линкер L включает полиэтиленгликолевый фрагмент.

104. Конъюгат по любому из пп. 90-103, где линкер L представляет собой



где m представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где  $\sim \dagger$  указывает точку присоединения к  $Y^{PTE}$ , и  $\sim \ddagger$  указывает точку присоединения к остальной части конъюгата.

105. Конъюгат по любому из пп. 1 и 4-104, где P включает один или несколько сайтов CpG.

106. Конъюгат по любому из пп. 1 и 4-105, где P включает по меньшей мере 3 сайта CpG.

107. Конъюгат по любому из пп. 1-4 и 6-106, где антитело включает две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два Q-tag пептида; где каждый из Q-tag пептидов связан с С-концом одной из тяжелых цепей антитела; и где один из Q-tag

пептидов связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом (P) через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L).

108. Конъюгат по любому из пп. 1-107, где:

(a) антитело включает легкую цепь, включающую последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:236-247 и 1000-1022, и/или тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:224-235 и 1030-1065;

(b) антитело включает легкую цепь, включающую последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:236-247 и 1000-1022, и/или тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1070-1117;

(c) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:236, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:224;

(d) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:237, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:225;

(e) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:238, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:226;

(f) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:239, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:227;

(g) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:240, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:228;

(h) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:241, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:229;

(i) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:242, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:230;

(j) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:243, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:231;

(k) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:244, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:232;

(l) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:245, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:233;

(m) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:246, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:234;

(n) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:247, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:235;

(o) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1000, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1030;

(p) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1001, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1031;











(ssss) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1021, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1116; или

(tttt) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1022, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1117.

109. Антитело, которое специфически связывается с нектином-4 человека, при этом антитело включает домен, представляющий собой переменную область легкой цепи (VL), и домен, представляющий собой переменную область тяжелой цепи (VH), где:

(a) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942 и 944, и VH-домен включает последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943 и 945;

(b) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:248, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:249;

(c) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:250, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:251;

(d) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:252, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:253;

(e) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:254, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:255;

(f) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:256, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:257;

(g) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:258, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:259;

(h) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:260, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:261;

(i) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:262, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:263;

(j) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:264, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена



(x) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:920, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:921;

(y) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:922, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:923;

(z) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:924, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:925;

(aa) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:926, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:927;

(bb) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:928, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:929;

(cc) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:930, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:931;

(dd) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена **SEQ ID NO:932**, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:933;

(ee) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:934, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:935;

(ff) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:936, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:937;

(gg) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:938, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:939;

(hh) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:940, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:941;

(ii) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:942, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:943; или

(jj) VL-домен включает последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из VL-домена SEQ ID NO:944, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из VH-домена SEQ ID NO:945.

110. Антитело по п. 109, где:







(u) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:443, CDR-H2 включает SEQ ID NO:444, CDR-H3 включает SEQ ID NO:445, CDR-L1 включает SEQ ID NO:440, CDR-L2 включает SEQ ID NO:441 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:442;

(v) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:461, CDR-H2 включает SEQ ID NO:462, CDR-H3 включает SEQ ID NO:463, CDR-L1 включает SEQ ID NO:458, CDR-L2 включает SEQ ID NO:459 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:460;

(w) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:287, CDR-H2 включает SEQ ID NO:288, CDR-H3 включает SEQ ID NO:289, CDR-L1 включает SEQ ID NO:284, CDR-L2 включает SEQ ID NO:285 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:286;

(x) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:305, CDR-H2 включает SEQ ID NO:306, CDR-H3 включает SEQ ID NO:307, CDR-L1 включает SEQ ID NO:302, CDR-L2 включает SEQ ID NO:303 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:304;

(y) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:323, CDR-H2 включает SEQ ID NO:324, CDR-H3 включает SEQ ID NO:325, CDR-L1 включает SEQ ID NO:320, CDR-L2 включает SEQ ID NO:321 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:322;

(z) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:341, CDR-H2 включает SEQ ID NO:342, CDR-H3 включает SEQ ID NO:343, CDR-L1 включает SEQ ID NO:338, CDR-L2 включает SEQ ID NO:339 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:340;

(aa) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:359, CDR-H2 включает SEQ ID NO:360, CDR-H3 включает SEQ ID NO:361, CDR-L1 включает SEQ ID NO:356, CDR-L2 включает SEQ ID NO:357 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:358;

(bb) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:377, CDR-H2 включает SEQ ID NO:378, CDR-H3 включает SEQ ID NO:379, CDR-L1 включает SEQ ID NO:374, CDR-L2 включает SEQ ID NO:375 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:376;

(cc) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:395, CDR-H2 включает SEQ ID NO:396, CDR-H3 включает SEQ ID NO:397, CDR-L1 включает SEQ ID NO:392, CDR-L2 включает SEQ ID NO:393 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:394;

(dd) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:413, CDR-H2 включает SEQ ID NO:414, CDR-H3 включает SEQ ID NO:415, CDR-L1 включает SEQ ID NO:410, CDR-L2 включает SEQ ID NO:411 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:412;

(ee) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:431, CDR-H2 включает SEQ ID NO:432, CDR-H3 включает SEQ ID NO:433, CDR-L1 включает SEQ ID NO:428, CDR-L2 включает SEQ ID NO:429 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:430;

(ff) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:449, CDR-H2 включает SEQ ID NO:450, CDR-H3 включает SEQ ID NO:451, CDR-L1 включает SEQ ID NO:446, CDR-L2 включает SEQ ID NO:447 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:448;

(gg) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:467, CDR-H2 включает SEQ ID NO:468, CDR-H3 включает SEQ ID NO:469, CDR-L1 включает SEQ ID NO:464, CDR-L2 включает SEQ ID NO:465 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:466;

(hh) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:479, CDR-H2 включает SEQ ID NO:480, CDR-H3 включает SEQ ID NO:481, CDR-L1 включает SEQ ID NO:476, CDR-L2 включает SEQ ID NO:477 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:478;

(ii) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:485, CDR-H2 включает SEQ ID NO:486, CDR-H3 включает SEQ ID NO:487, CDR-L1 включает SEQ ID NO:482, CDR-L2 включает SEQ ID NO:483 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:484;

(jj) VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:473, CDR-H2 включает SEQ ID NO:474, CDR-H3 включает SEQ ID NO:475, CDR-L1 включает SEQ ID NO:470, CDR-L2 включает SEQ ID NO:471 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:472;

(kk) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:562, CDR-L2 включает SEQ ID NO:563 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:564, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:565, CDR-H2 включает SEQ ID NO:566 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:567;

(ll) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:580, CDR-L2 включает SEQ ID NO:581 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:582, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:583, CDR-H2 включает SEQ ID NO:584 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:585;

(mm) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:598, CDR-L2 включает SEQ ID NO:599 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:600, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:601, CDR-H2 включает SEQ ID NO:602 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:603;

(nn) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:616, CDR-L2 включает SEQ ID NO:617 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:618, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:619, CDR-H2 включает SEQ ID NO:620 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:621;



(yy) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:814, CDR-L2 включает SEQ ID NO:815 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:816, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:817, CDR-H2 включает SEQ ID NO:818 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:819; или

(zz) VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где CDR-L1 включает SEQ ID NO:832, CDR-L2 включает SEQ ID NO:833 и CDR-L3 включает SEQ ID NO:834, где CDR-H1 включает SEQ ID NO:835, CDR-H2 включает SEQ ID NO:836 и CDR-H3 включает SEQ ID NO:837.

111. Антитело по п. 109 или п. 110, где:

(a) VH-домен включает последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943 и 945, и/или VL-домен включает последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942 и 944;

(b) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:248 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:249;

(c) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:250 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:251;

(d) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:252 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:253;

(e) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:254 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:255;

(f) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:256 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:257;

(g) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:258 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:259;

(h) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:260 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:261;

(i) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:262 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:263;

(j) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:264 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:265;

(k) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:266 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:267;

(l) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:268 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:269;

(m) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:270 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:271;



(hh) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:940 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:941;

(ii) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:942 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:943; или

(jj) VL-домен включает последовательность SEQ ID NO:944 и/или VH-домен включает последовательность SEQ ID NO:945.

112. Антитело по любому из пп. 109-111, где антитело связано с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), включающими по меньшей мере один глутаминовый остаток.

113. Антитело по п. 112, где антитело включает две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, и где один Q-tag присоединен к одной или обоим тяжелым цепям антитела.

114. Антитело по п. 112, где Q-tag слит с С-концом тяжелой цепи антитела.

115. Антитело по любому из пп. 112-114, где каждый Q-tag независимо включает пептидную последовательность, включающую от 5 до 15 аминокислотных остатков.

116. Антитело по любому из пп. 112-115, где Q-tag имеет природное происхождение.

117. Антитело по любому из пп. 112-115, где пептидная последовательность каждого Q-tag независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:39-55.

118. Антитело по любому из пп. 112-115, где Q-tag включает пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47).

119. Антитело по любому из пп. 112-115, где каждый Q-tag независимо включает RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQGFPP (SEQ ID NO:48) или RPQGFPP (SEQ ID NO:49).

120. Антитело по любому из пп. 109-119, где 1 или 2 Q-tag связан/связаны с антителом.

121. Антитело по любому из пп. 109-120, где антитело дополнительно включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:92-107, 111, 112, 178 и 494-497.

122. Антитело по любому из пп. 109-121, где антитело представляет собой Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab'-SH, F<sub>v</sub>, scF<sub>v</sub>, однодоменное, содержащее только одну тяжелую цепь или содержащее только одну легкую цепь антитела, или фрагмент антитела.

123. Антитело по любому из пп. 109-119, где антитело включает Fc-область.

124. Антитело по п. 123, где Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, выбранную из группы, состоящей из Fc-области IgG1, Fc-области IgG2 и Fc-области IgG4.

125. Антитело по п. 123 или п. 124, где Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые уменьшают связывание с C1q.

126. Конъюгат по п. 123 или п. 124, где Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен,

которые повышают связывание с C1q.

127. Конъюгат по п. 123 или п. 124, где Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, демонстрирующую активность дикого типа, связанную с активацией комплемента.

128. Конъюгат по п. 123 или п. 124, где Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые повышают активацию комплемента.

129. Конъюгат по п. 123 или п. 124, где Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен и демонстрирующую связывающую активность дикого типа в отношении C1q.

130. Антитело по п. 123 или п. 124, где Fc-область представляет собой человеческую Fc-область, включающую одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают эффекторную функцию по сравнению с человеческой Fc-областью, которая не содержит аминокислотную замену(замены).

131. Антитело по п. 123 или п. 124, где Fc-область представляет собой:

(a) Fc-область IgG1 человека, включающую замены L234A, L235A и/или G237A, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом;

(b) Fc-область IgG2 человека, включающую замены A330S и/или P331S, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом; или

(c) Fc-область IgG4 человека, включающую замены S228P и/или L235E, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом.

132. Антитело по п. 123 или п. 124, где Fc-область дополнительно включает замену N297A, где нумерация аминокислотного положения приведена в соответствии с EU-индексом.

133. Антитело по п. 123 или п. 124, где Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1 дикого типа.

134. Антитело по п. 123 или п. 124, где Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1, которая сконструирована так, чтобы улучшить антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC).

135. Антитело по любому из пп. 123-124 или 133-134, где по меньшей мере одна или две из тяжелых цепей антитела являются нефукозилированными.

136. Антитело по п. 135, где антитело получают в клеточной линии с нокаутом альфа1,6-фукозилтрансферазы (Fut8).

137. Антитело по п. 135 или п. 136, где антитело получают в клеточной линии, сверхэкспрессирующей  $\beta$ 1,4-N-ацетилгликозилтрансферазу III (GnT-III).

138. Антитело по п. 136 или п. 137, где клеточная линия дополнительно сверхэкспрессирует  $\mu$ -маннозидазу Гольджи II (ManII).

139. Антитело по любому из пп. 134-138, где антитело включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает ADCC активность.

140. Антитело по любому из пп. 123-124 или 134-139, где антитело включает по



меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает ADCP активность.

141. Антитело по любому из пп. 123-124 или 134-140, где антитело включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает CDC активность.

142. Антитело по любому из пп. 123-124 или 134-141, где Fc-область включает замену G236A, где нумерация указана в соответствии с EU-индексом.

143. Антитело по любому из пп. 123-124 или 134-141, где Fc-область включает замену G236A, где нумерация указана в соответствии с EU-индексом, и Fc-область является нефукозилированной.

144. Антитело по любому из пп. 109-143, где:

(a) антитело включает легкую цепь, включающую последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:236-247 и 1000-1022, и/или тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:224-235 и 1030-1065;

(b) антитело включает легкую цепь, включающую последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:236-247 и 1000-1022, и/или тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1070-1117;

(c) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:236, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:224;

(d) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:237, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:225;

(e) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:238, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:226;

(f) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:239, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:227;

(g) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:240, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:228;

(h) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:241, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:229;

(i) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:242, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:230;

(j) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:243, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:231;

(k) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:244, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:232;

(l) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:245, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:233;









(oooo) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1017, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1112;

(pppp) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1018, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1113;

(qqqq) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1019, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1114;

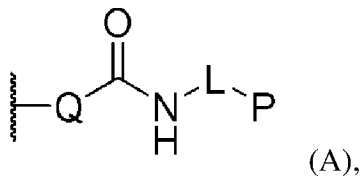
(rrrr) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1020, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1115;

(ssss) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1021, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1116; или

(tttt) антитело включает легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1022, и/или тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1117.

145. Антитело по любому из пп. 109-144, где антитело представляет собой биспецифическое или мультиспецифическое антитело, которое включает по меньшей мере второй VL-домен и второй VH-домен, где второй VL-домен и второй VH-домен специфически связываются с другой мишенью, отличной от нектина-4 человека.

146. Способ получения конъюгата, который включает (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab), которые специфически связываются с нектином-4 человека, и (ii) один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), включающими аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A),



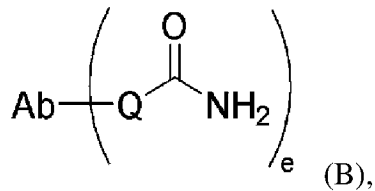
где:

~~~~~ указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, связанную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

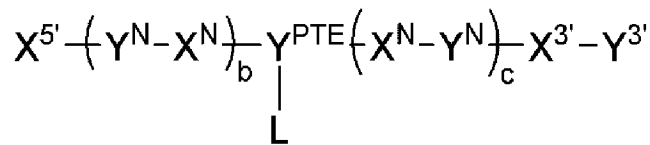
каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, включающий контактирование соединения формулы (B)



где Ab и Q имеют значение, определенное для формулы (A) выше, и e представляет собой целое число от 1 до 20,

с одним или несколькими иммуномодулирующими олигонуклеотидами P, где каждый P независимо:

(i) имеет следующую формулу:



где

X<sup>5'</sup> представляет собой 5'-концевой нуклеозид;

X<sup>3'</sup> представляет собой 3'-концевой нуклеозид;

Y<sup>PTE</sup> представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир;

Y<sup>3'</sup> представляет собой концевой фосфотриэфир;

каждый X<sup>N</sup> независимо представляет собой нуклеозид;

каждый Y<sup>N</sup> независимо представляет собой межнуклеозидный линкер;

b и c каждый независимо представляет собой целое число от 1 до 25; при условии, что сумма b и c равна по меньшей мере 5; и

L представляет собой линкерную группу, включающую концевой амин; или

(ii) представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C) или (D);

в присутствии трансглутаминазы.

147. Способ по п. 146, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид независимо представляет собой олигонуклеотид формулы (C) или формулы (D), выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов Таблицы 4 и Таблицы 6.

148. Способ по п. 146 или п. 147, где антитело соответствует антителу по любому из пп. 109-145.

149. Способ по любому из пп. 146-148, дополнительно включающий отделение конъюгата, имеющего значение DAR, равное 1, от свободного олигонуклеотида, неконъюгированного антитела и конъюгатов, имеющих значение DAR, равное 2.

150. Конъюгат, включающий антитело по любому из пп. 109-145, конъюгированное с агентом.

151. Конъюгат по п. 150, где агент представляет собой метку.

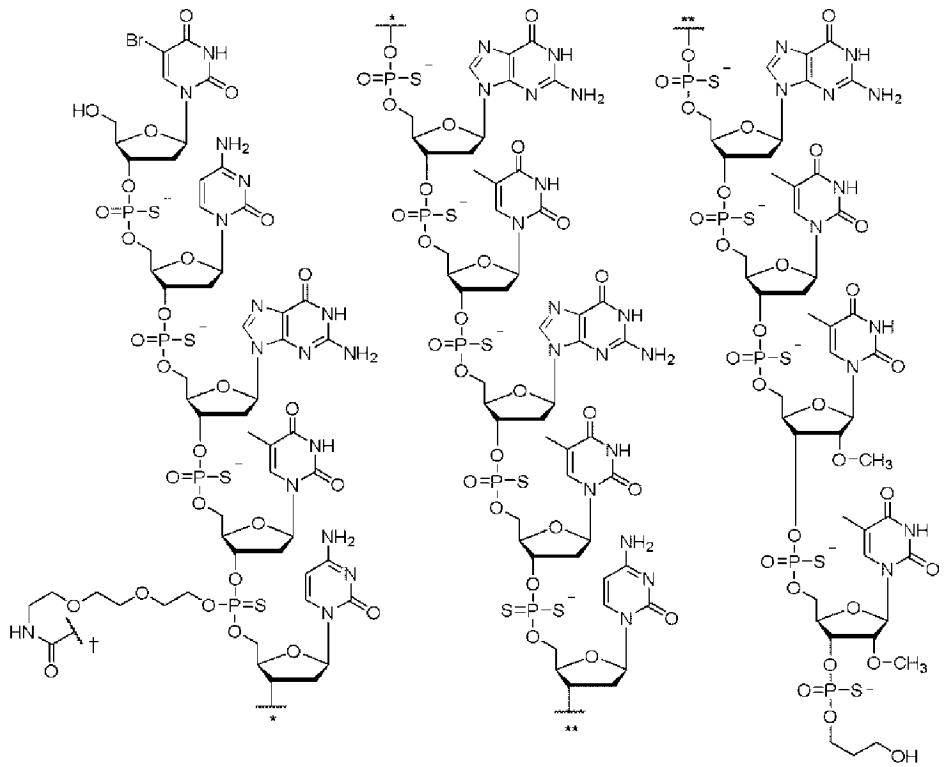
152. Конъюгат по п. 150, где агент представляет собой цитотоксическое средство.

153. Конъюгат по п. 150, где агент представляет собой средство, которое





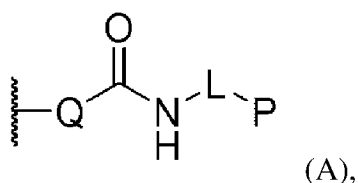
каждый Р независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



где  $\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где  $\sim^\dagger$  указывает точку присоединения к линкеру L;

при этом антитело включает домен, представляющий собой вариабельную область тяжелой цепи (VH), и домен, представляющий собой вариабельную область легкой цепи (VL), где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID NO:275, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID NO:276, CDR-H3 включает последовательность SEQ ID NO:277, CDR-L1 включает последовательность SEQ ID NO:272, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID NO:273 и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID NO:274.

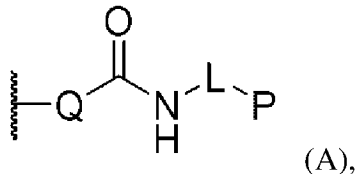
163. Конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)





последовательность SEQ ID NO:399 и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID NO:400.

164. Конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)

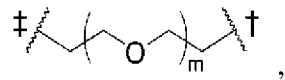


где:

~~~~~ указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

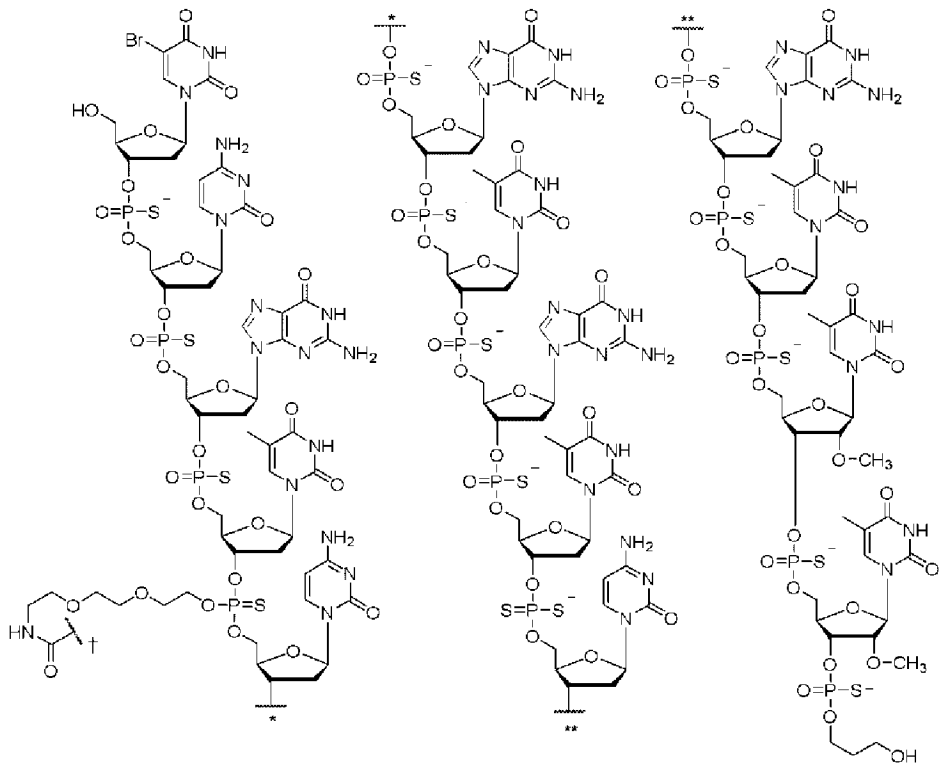
каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF<sub>2</sub>GPP (SEQ ID NO:49);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



где m представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где ~~~~ † указывает точку присоединения к P, и ~~~~ † указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

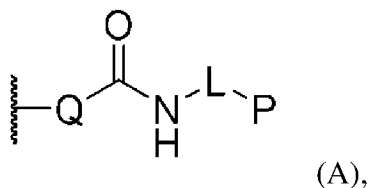
каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



где  $\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где  $\sim^\dagger$  указывает точку присоединения к линкеру L;

при этом антитело включает домен, представляющий собой вариабельную область тяжелой цепи (VH), и домен, представляющий собой вариабельную область легкой цепи (VL), где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID NO:679, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID NO:680, CDR-H3 включает последовательность SEQ ID NO:681, CDR-L1 включает последовательность SEQ ID NO:676, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID NO:677 и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID NO:678.

165. Конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)

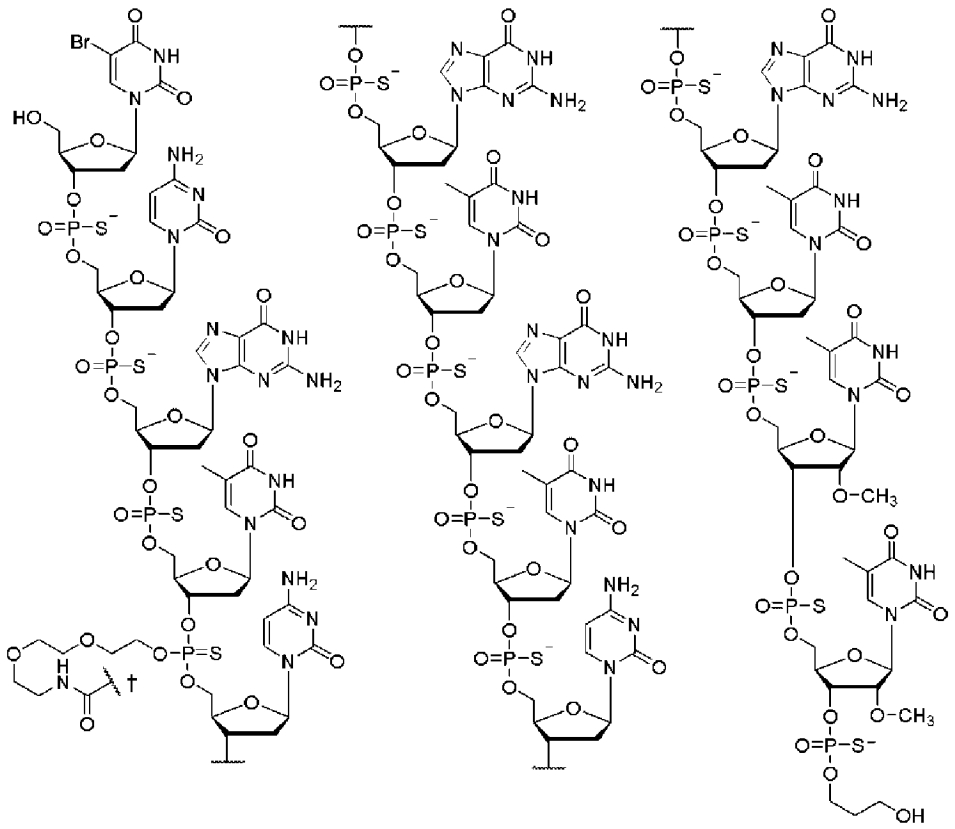


где:

$\sim$  указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его



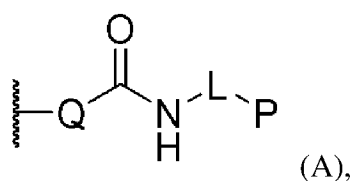




где  $\sim^*$  и  $\sim^{**}$  указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где  $\sim^\dagger$  указывает точку присоединения к линкеру L;

при этом антитело включает домен, представляющий собой вариабельную область тяжелой цепи (VH), и домен, представляющий собой вариабельную область легкой цепи (VL), где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID NO:401, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID NO:402, CDR-H3 включает последовательность SEQ ID NO:403, CDR-L1 включает последовательность SEQ ID NO:398, CDR-L2 включает последовательность SEQ ID NO:399 и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID NO:400.

167. Конъюгат, включающий (i) антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими Q-tag пептидами (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-tag пептидом через амидную связь с глутаминовым остатком Q-tag пептида и линкер (L), как показано в формуле (A)

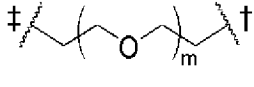


где:

~~~~ указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

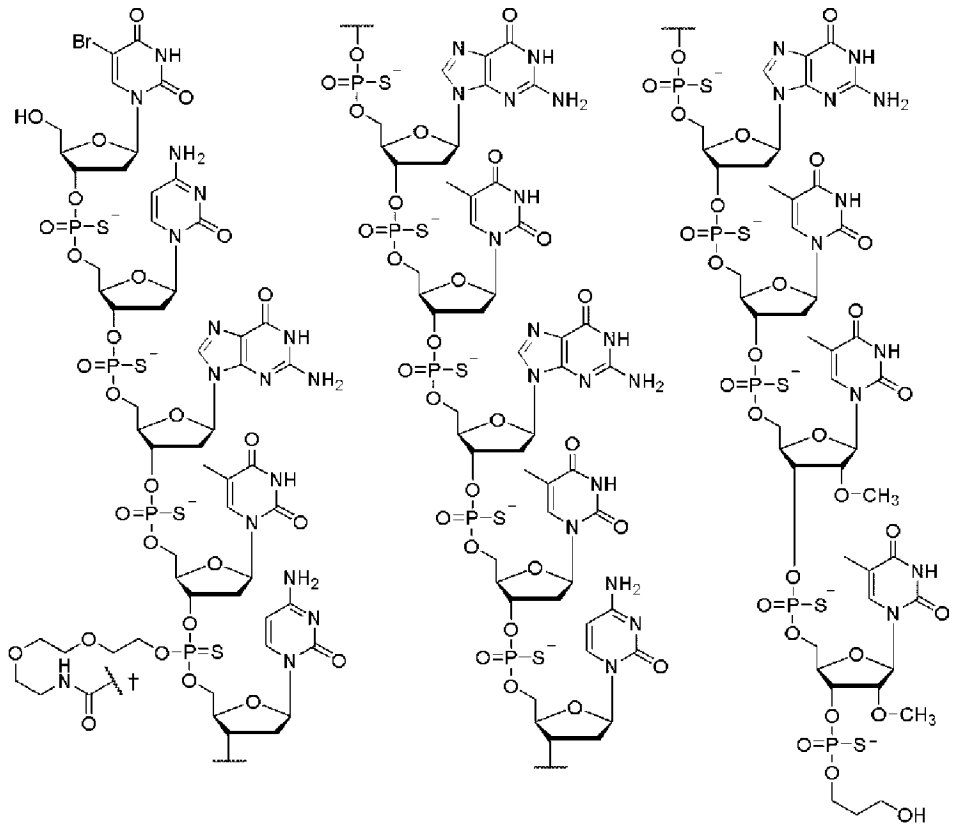
каждый Q независимо включает последовательность Q-tag пептида RPQGF<sub>2</sub>GPP (SEQ ID NO:49);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



где m представляет собой целое число от около 0 до около 50, и где ~~~~† указывает точку присоединения к Р, и ~~~~‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый Р независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



где ~~~~\* и ~~~~\*\* указывают точки присоединения в олигонуклеотиде, и где ~~~~† указывает точку присоединения к линкеру L;

при этом антитело включает домен, представляющий собой вариабельную область тяжелой цепи (VH), и домен, представляющий собой вариабельную область легкой цепи (VL), где VH-домен включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-домен включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 включает последовательность SEQ ID NO:679, CDR-H2 включает последовательность SEQ ID NO:680, CDR-H3 включает последовательность SEQ ID NO:681, CDR-L1 включает последовательность SEQ ID NO:676, CDR-L2 включает



последовательность SEQ ID NO:677 и CDR-L3 включает последовательность SEQ ID NO:678.

168. Конъюгат по п. 162 или п. 165, где антитело включает (а) домен, представляющий собой переменную область тяжелой цепи (VH), включающую SEQ ID NO: 935, и домен, представляющий собой переменную область легкой цепи (VL), включающую SEQ ID NO: 934; (b) тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 1047, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 1017; (c) тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 1060, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 1017; (d) тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1099, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1017; или (e) тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1112, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1017.

169. Конъюгат по п. 163 или 166, где антитело включает (а) домен, представляющий собой переменную область тяжелой цепи (VH), включающую SEQ ID NO: 937, и домен, представляющий собой переменную область легкой цепи (VL), включающую SEQ ID NO: 936; (b) тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 1048, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1018; (c) тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 1061, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1018; (d) тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1100, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1018; или (e) тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1113, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1018.

170. Конъюгат по п. 164 или 167, где антитело включает (а) домен, представляющий собой переменную область тяжелой цепи (VH), включающую SEQ ID NO: 939, и домен, представляющий собой переменную область легкой цепи (VL), включающую SEQ ID NO: 938; (b) тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 1049, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 1019; (c) тяжелую цепь, включающую последовательность тяжелой цепи и Q-tag, где тяжелая цепь включает SEQ ID NO: 1062, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 1019; (d) тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1101, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1019; или (e) тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO:1114, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO:1019.

171. Конъюгат по любому из пп. 162-170, где  $m$  имеет значение от около 20 до около 30.

172. Конъюгат по любому из пп. 162-171, где  $m$  имеет значение около 24 или  $m$  имеет значение 24.

173. Конъюгат по любому из пп. 162-170, где  $L$  включает полиэтиленгликолевый фрагмент.

174. Конъюгат по п. 173, где полиэтиленгликолевый фрагмент содержит около 24 этиленгликолевых звеньев или содержит 24 этиленгликолевых звена.

175. Конъюгат по любому из пп. 162-164 или пп. 168-170, где каждый (P) и (L) в конъюгате независимо включают модифицированный олигонуклеотид SEQ ID NO:35.

176. Конъюгат по любому из пп. 165-170, где каждый (P) и (L) в конъюгате независимо включают модифицированный олигонуклеотид SEQ ID NO:9.

177. Конъюгат по любому из пп. 162-176, где антитело включает Fc-область.

178. Конъюгат по п. 177, где Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1.

179. Конъюгат по п. 177 или п. 178, где Fc-область является нефукозилированной.

180. Конъюгат по п. 177 или п. 178, где Fc-область включает замену G236A, где нумерация указана в соответствии с EU-индексом.

181. Конъюгат по п. 177 или п. 178, где Fc-область включает замену G236A, где нумерация указана в соответствии с EU-индексом, и Fc-область является нефукозилированной.

182. Конъюгат по любому из пп. 162-181, где конъюгат имеет значение DAR, равное 1 или 2.

183. Фармацевтическая композиция, включающая конъюгат по любому из пп. 162-182 и фармацевтически приемлемый носитель.

184. Способ для лечения рака, включающий введение субъекту эффективного количества конъюгата по любому из пп. 1-108, 150-160 или 162-182, или антитела по любому из пп. 109-145 или 160, или фармацевтической композиции по п. 161 или п. 183.

185. Способ по п. 184, где раковые опухолевые клетки сверхэкспрессируют нектин-4 по сравнению с нормальными клетками, из которых происходит рак.

186. Способ по п. 184, где раковые опухолевые клетки экспрессируют нормальные или умеренные уровни нектина-4 по сравнению с нормальными клетками, из которых происходит рак.

187. Способ по п. 184, где раковые опухолевые клетки экспрессируют низкие уровни нектина-4 по сравнению с нормальными клетками, из которых происходит рак.

188. Способ по любому из пп. 184-187, где способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного противоракового терапевтического средства.

189. Способ по п. 188, где по меньшей мере одно дополнительное противораковое терапевтическое средство включает химиотерапевтическое средство, иммунотерапевтическое средство, низкомолекулярный ингибитор (SMQ), терапевтическое антитело или противораковую вакцину.

190. Способ по любому из пп. 184-189, где рак представляет собой солидный рак.

191. Способ по любому из пп. 184-189, где рак представляет собой опухоль жидких тканей.

192. Способ по любому из пп. 184-189, где рак представляет собой рак пищевода, рак желудка, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, аденокарциному поджелудочной железы, карциному толстой кишки, рак мочевого пузыря, рак шейки

матки, рак щитовидной железы, рак матки, рак почки или рак желчного пузыря.

193. Способ по любому из пп. 184-192, где введение конъюгата или фармацевтической композиции активирует Т-клетки, дендритные клетки, моноциты и/или НК-клетки.

194. Способ активации иммунных клеток у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества конъюгата по любому из пп. 1-108, 150-160 или 162-182, или фармацевтической композиции по п. 161 или п. 183, включающей конъюгат по любому из пп. 1-108, 150-160 или 162-182, где введение конъюгата или фармацевтической композиции активирует Т-клетки, дендритные клетки, моноциты и/или НК-клетки.

195. Способ по п. 194, где субъект болен раком.

196. Способ по п. 194 или п. 195, где способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного противоракового терапевтического средства.

197. Способ по п. 196, где по меньшей мере одно дополнительное противораковое терапевтическое средство включает химиотерапевтическое средство, иммунотерапевтическое средство, низкомолекулярный ингибитор (SMQ), терапевтическое антитело или противораковую вакцину.

198. Способ по любому из пп. 195-197, где рак представляет собой солидный рак.

199. Способ по любому из пп. 195-197, где рак представляет собой опухоль жидких тканей.

200. Способ по любому из пп. 195-197, где рак представляет собой рак пищевода, рак желудка, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, аденокарциному поджелудочной железы, карциному толстой кишки, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак матки, рак почки или рак желчного пузыря.

201. Способ по любому из пп. 195-200, где рак является рефрактерным к терапии ингибитором иммунной контрольной точки.

202. Способ по п. 201, где терапия ингибитором иммунной контрольной точки включает ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1.

203. Способ лечения опухоли или опухолевых клеток, включающий введение эффективного количества конъюгата по любому из пп. 1-108, 150-160, 162-182, антитела по любому из пп. 109-145 или фармацевтической композиции по п. 161 или п. 183.

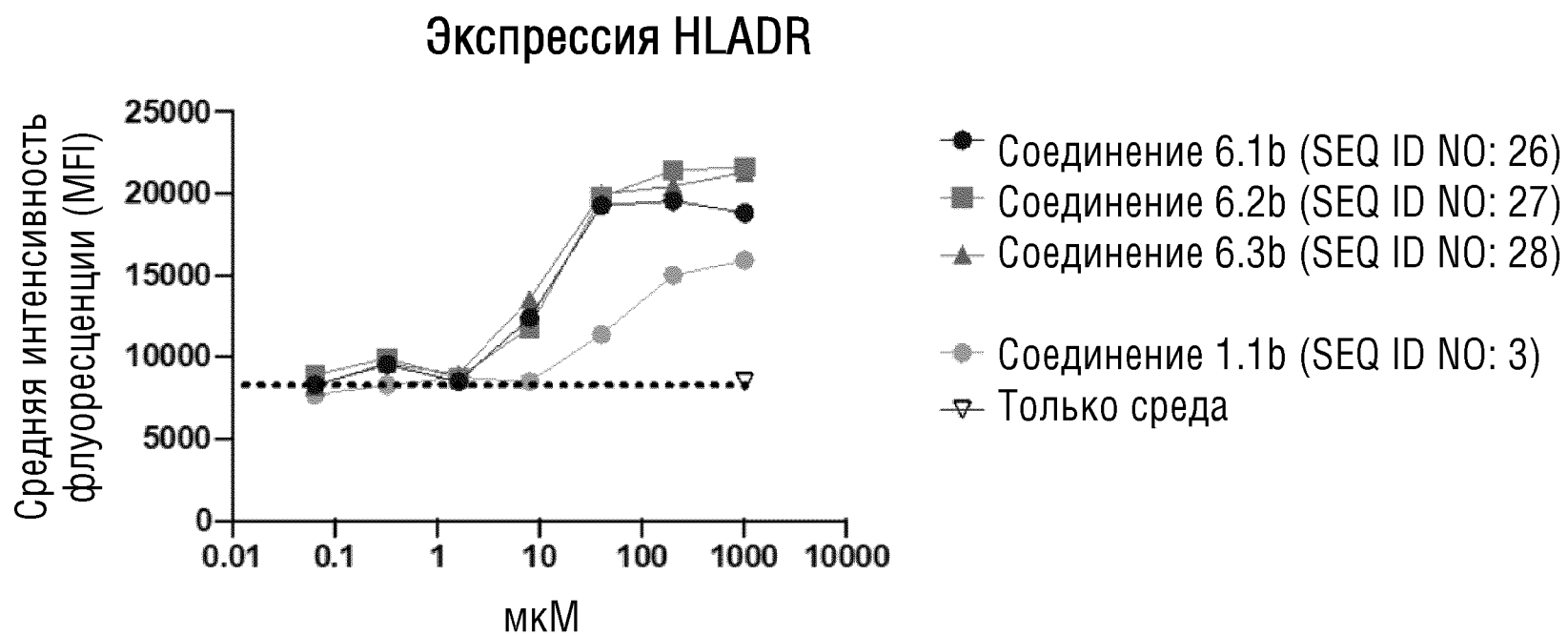
204. Способ по п. 203, где лечение опухоли или опухолевых клеток включает уничтожение опухоли или опухолевых клеток, индукцию цитотоксичности опухоли или опухолевых клеток, уменьшение или ингибирование жизнеспособности опухоли или опухолевых клеток, ингибирование роста опухоли или опухолевых клеток, ингибирование образования опухоли или опухолевых клеток, ингибирование или уменьшение метастазирования опухоли или опухолевых клеток, уменьшение размера опухоли или активацию иммунного ответа против опухоли или опухолевых клеток.

205. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело конъюгата по любому из пп. 1-108, 150-160 или 162-182 или антитело по любому из пп. 109-145 или 160.

206. Вектор, включающий нуклеиновую кислоту по п. 205.
207. Вектор по п. 206, который представляет собой вектор экспрессии.
208. Клетка-хозяин, включающая вектор по п. 206 или п. 207.
209. Клетка-хозяин по п. 208, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, клетку дрожжей или бактериальную клетку.
210. Клетка-хозяин по п. 209, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, которая представляет собой клетку СНО.
211. Способ получения антитела по любому из пп. 109-145, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп. 208-210 в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела в клетке-хозяине.
212. Способ по п. 211, дополнительно включающий выделение и/или очистку антитела из клетки-хозяина.

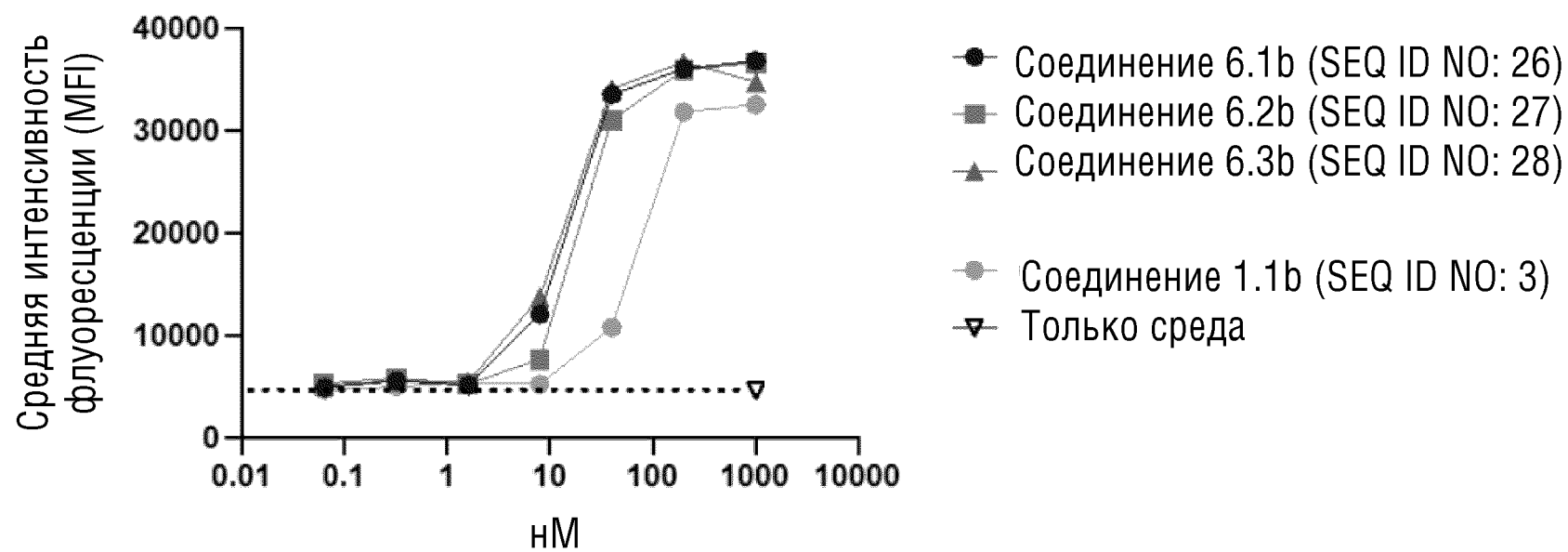
По доверенности

ФИГ.1А

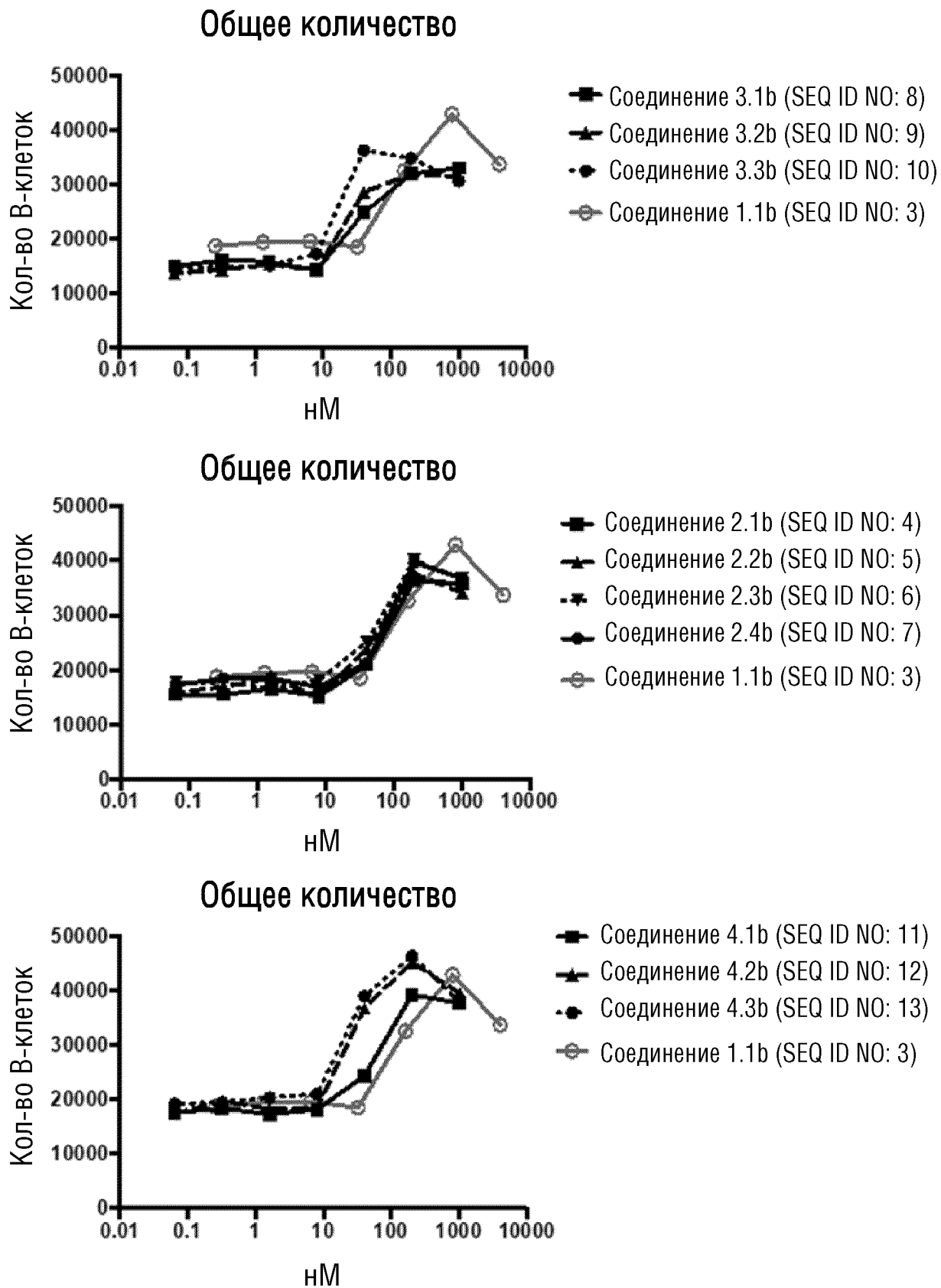


ФИГ.1В

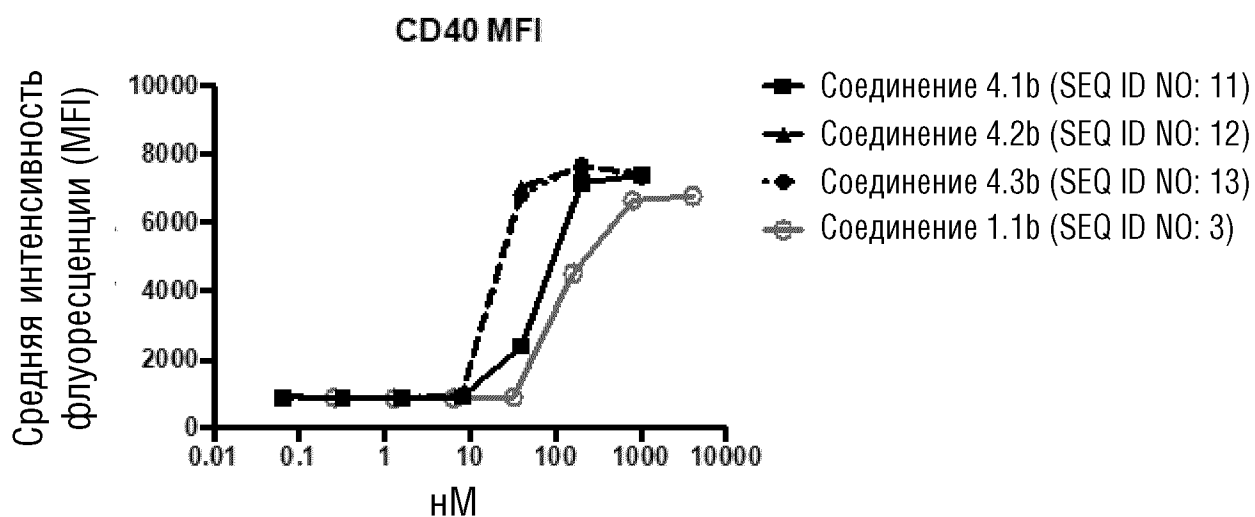
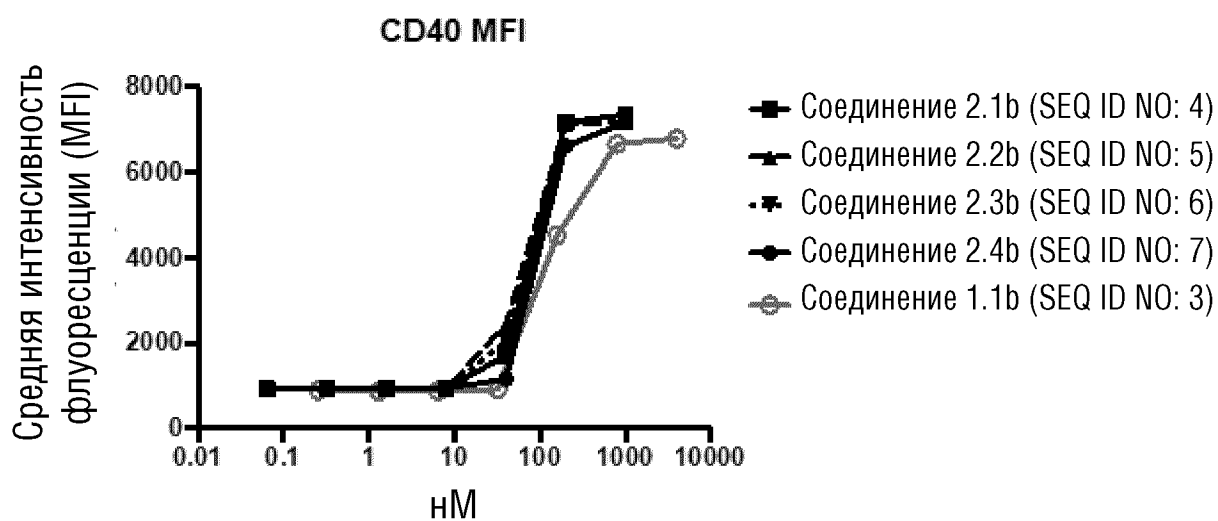
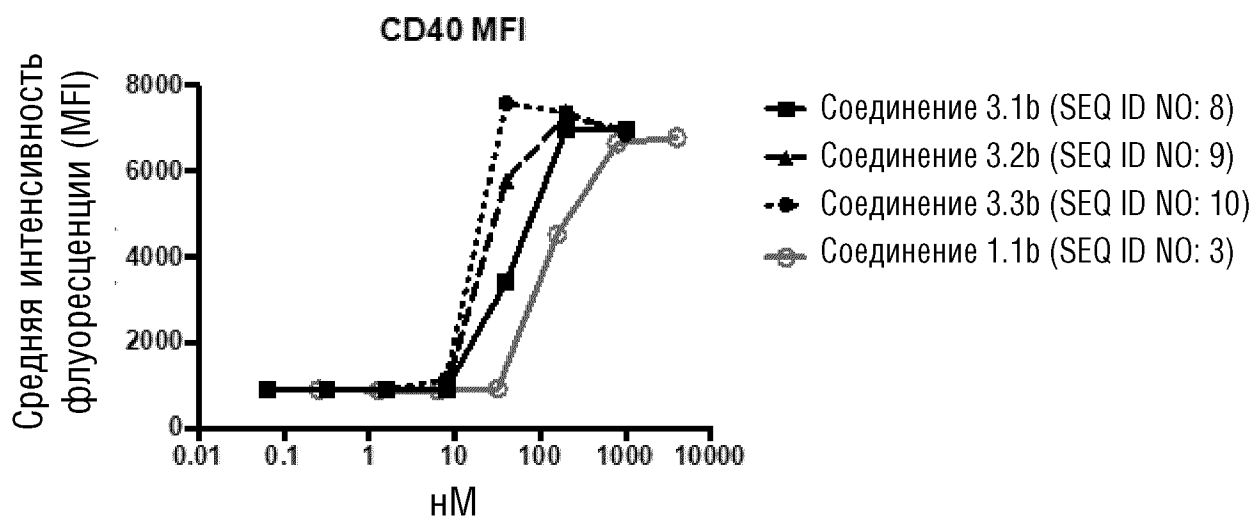
### Экспрессия CD40



ФИГ.2А

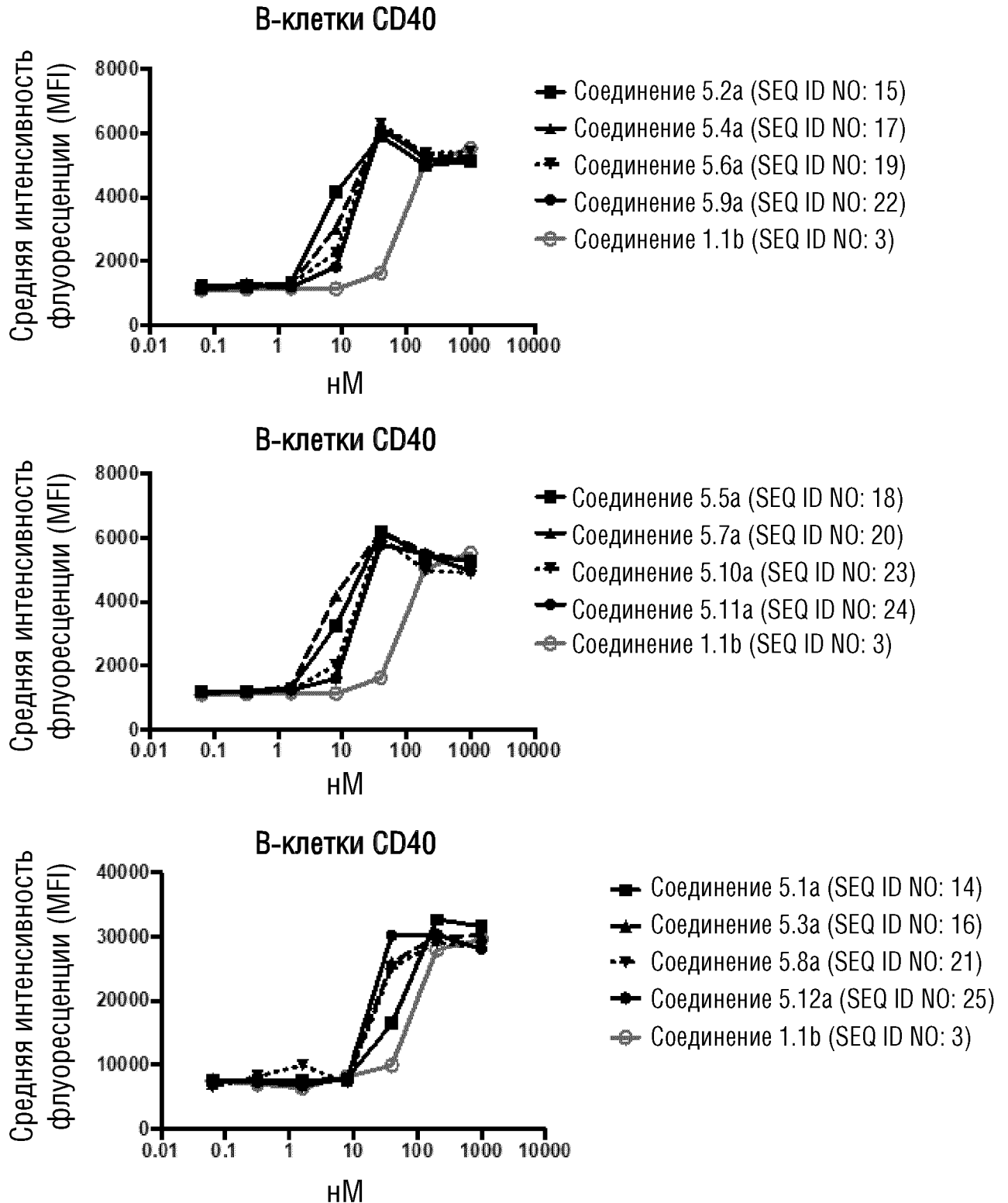


## ФИГ.2В

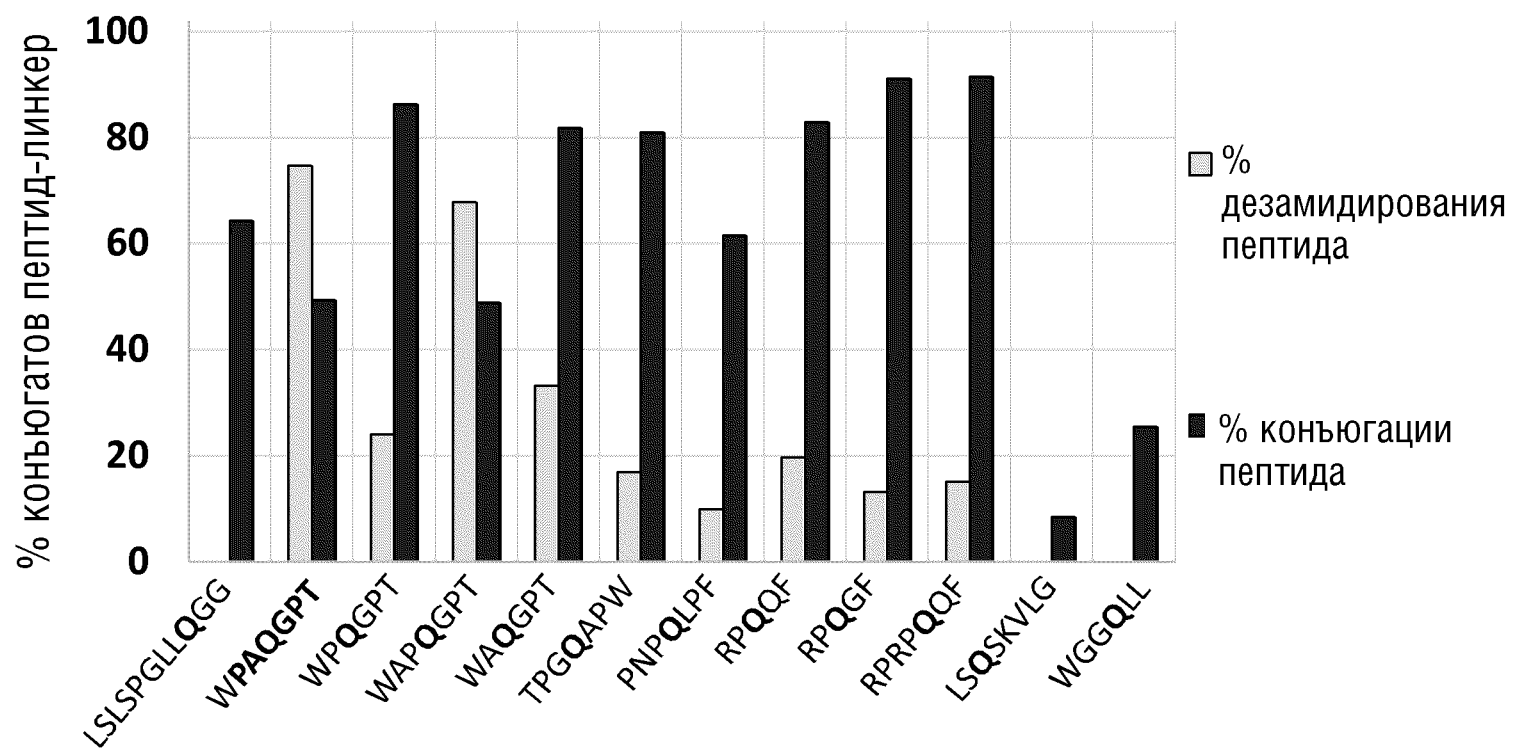




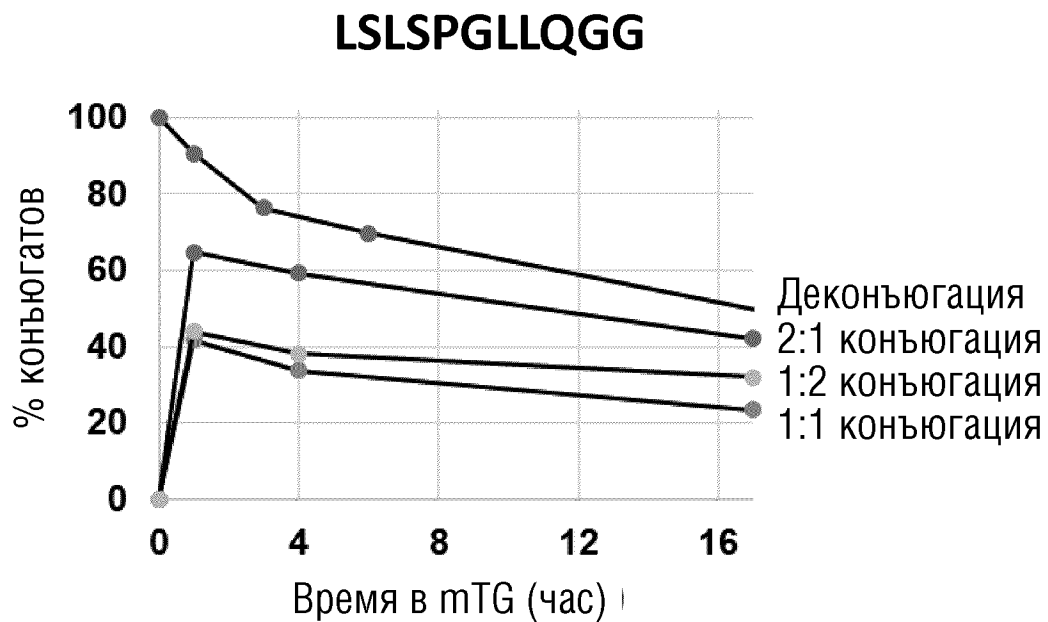
## ФИГ.2С



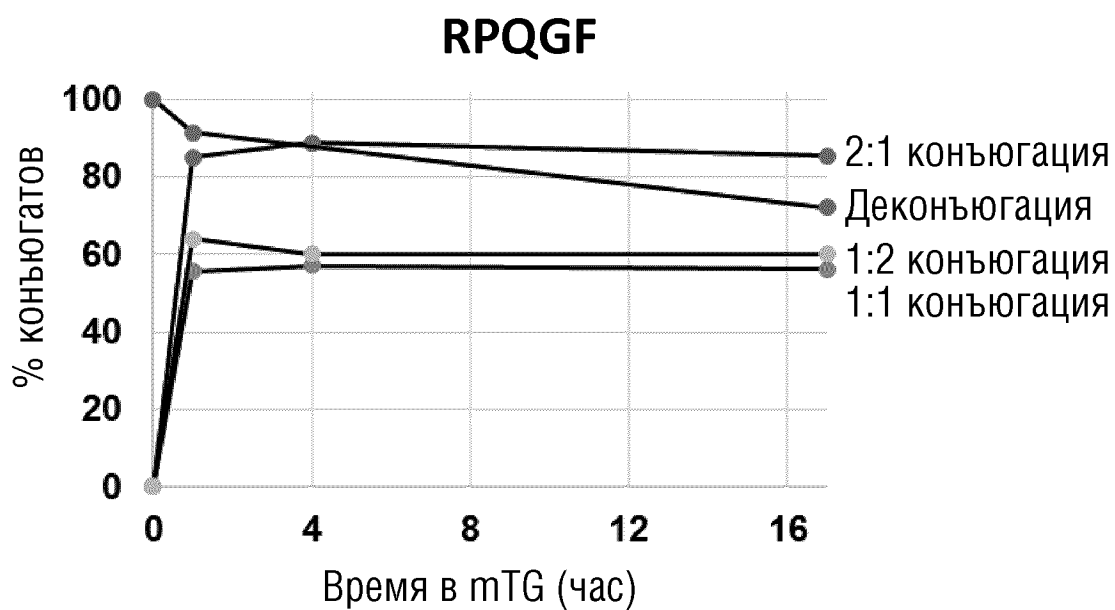
ФИГ.3



ФИГ.4А

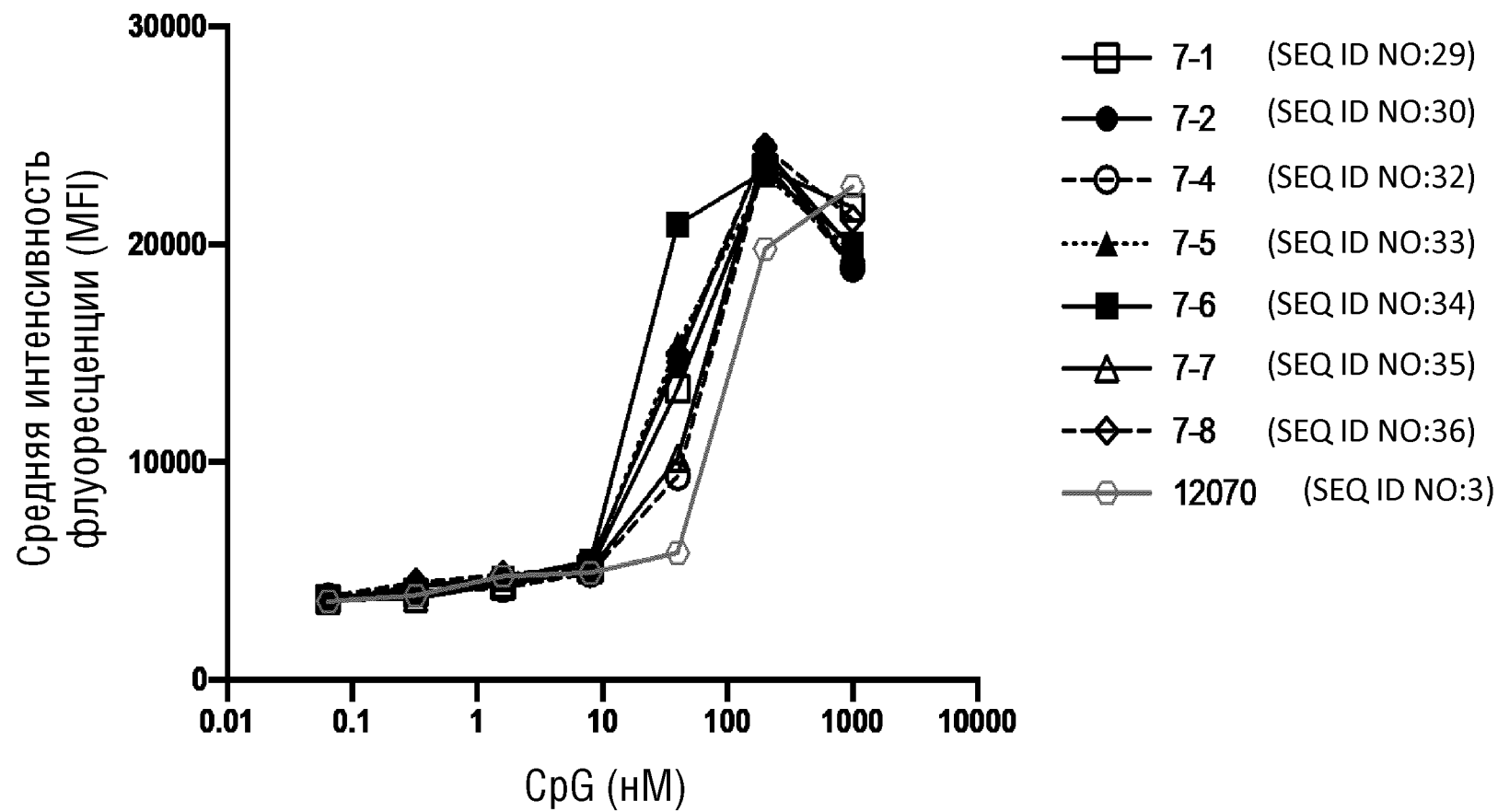


ФИГ.4В

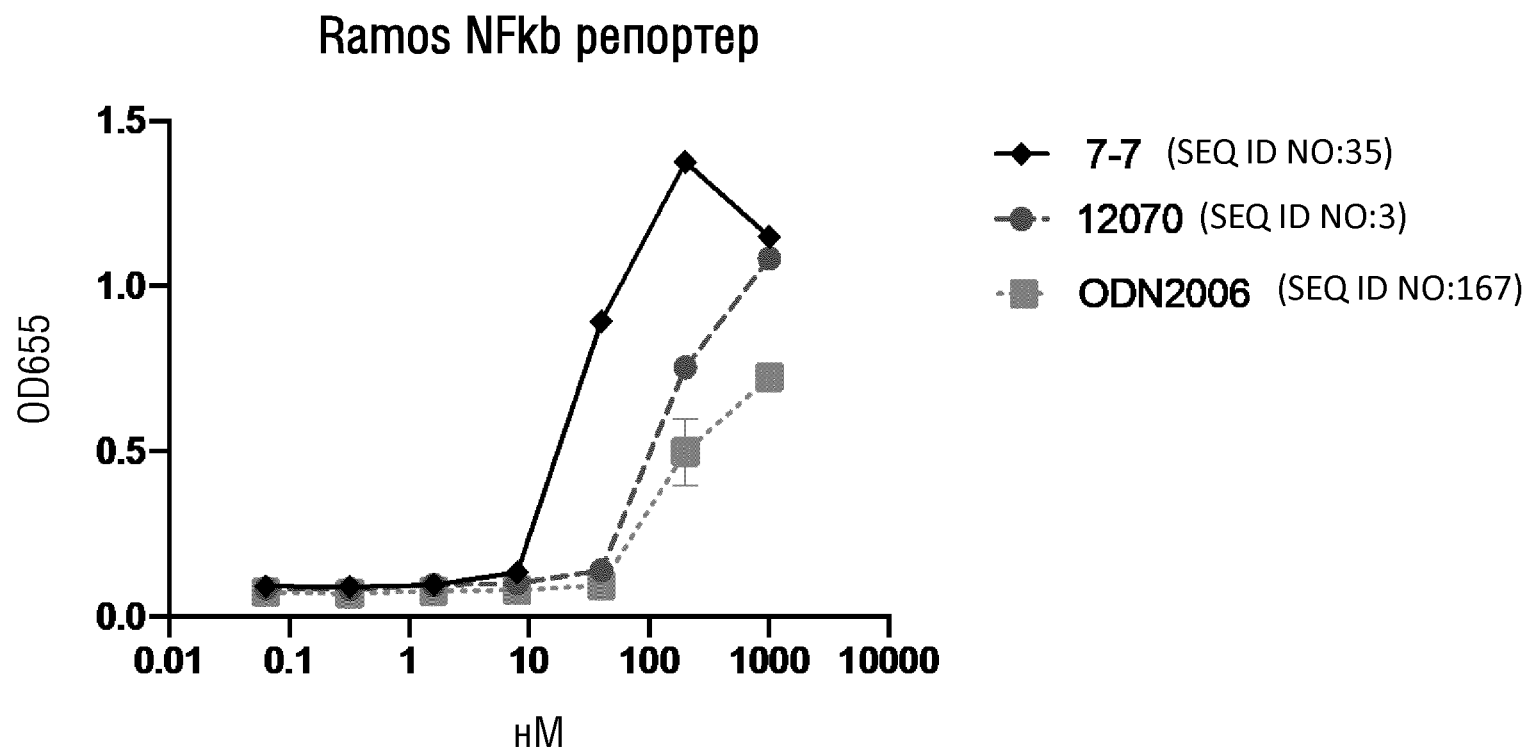


# ФИГ.5

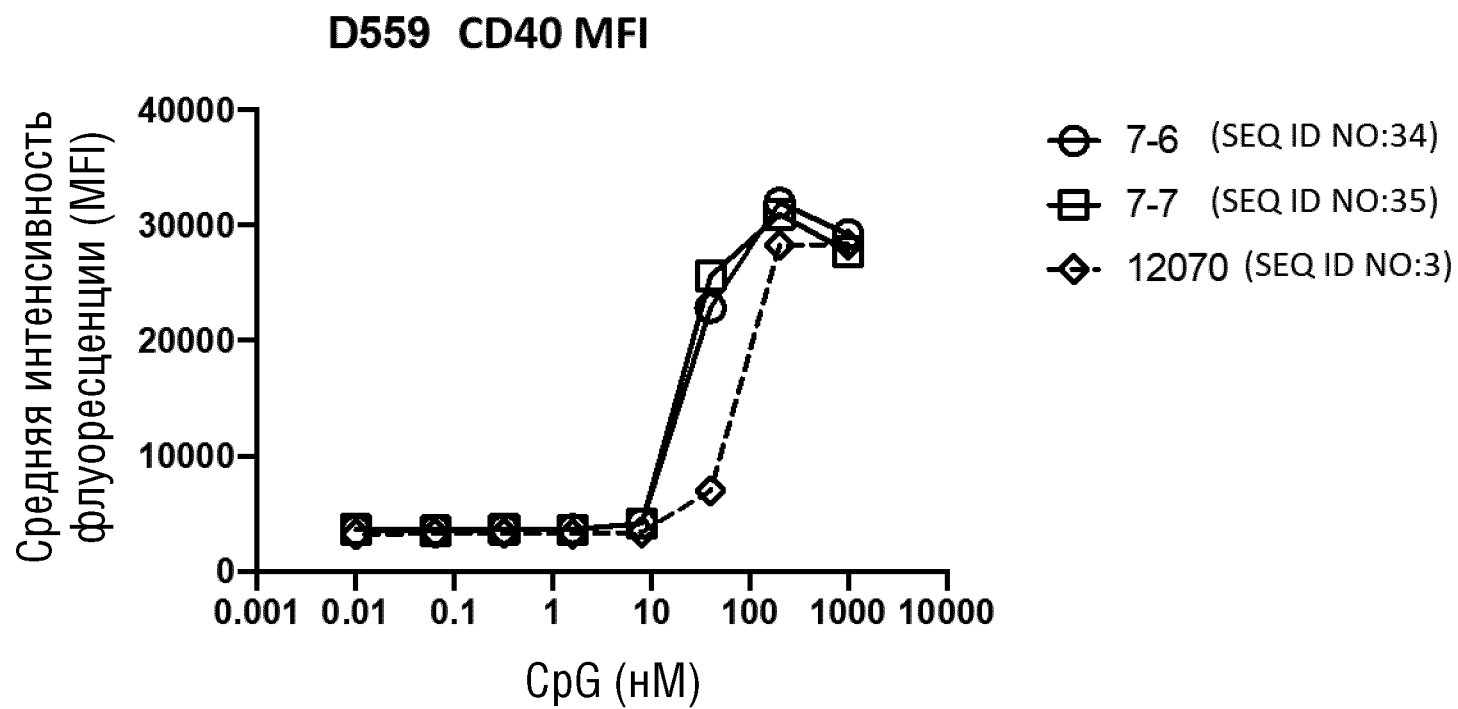
## CD40 MFI CpG



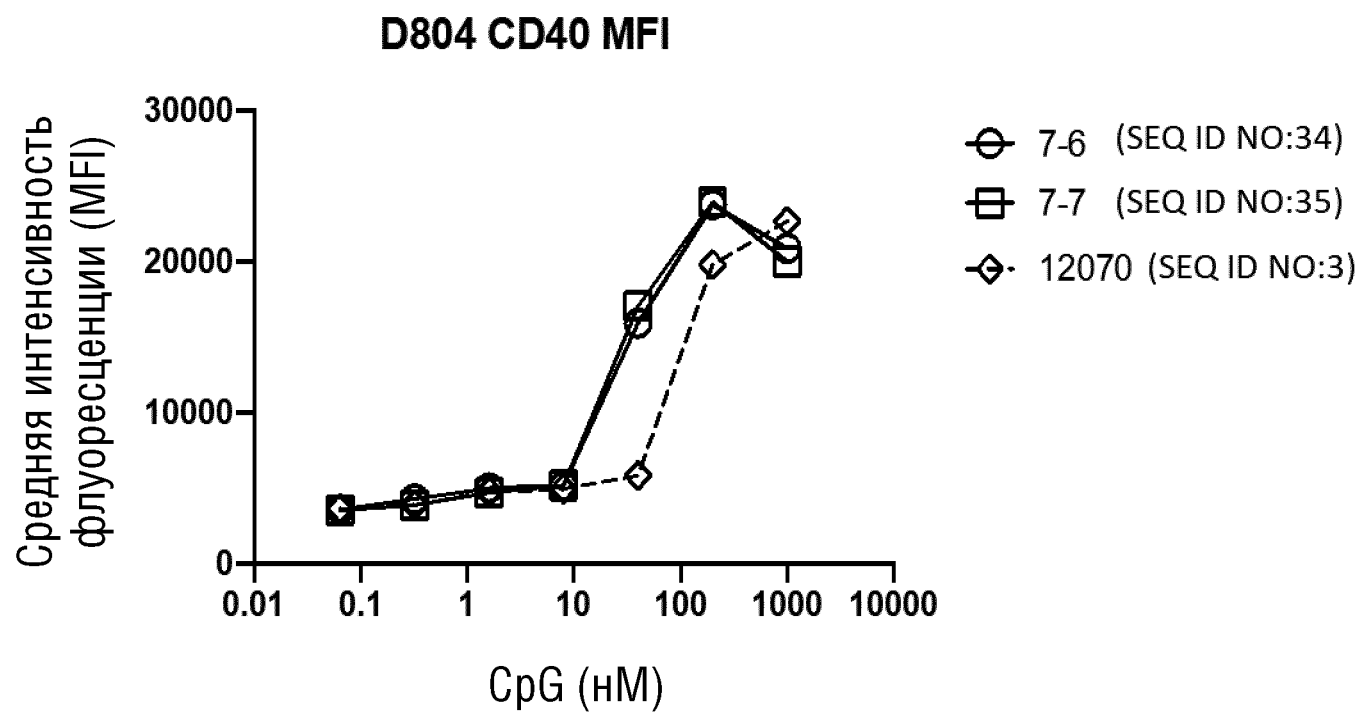
ФИГ.6



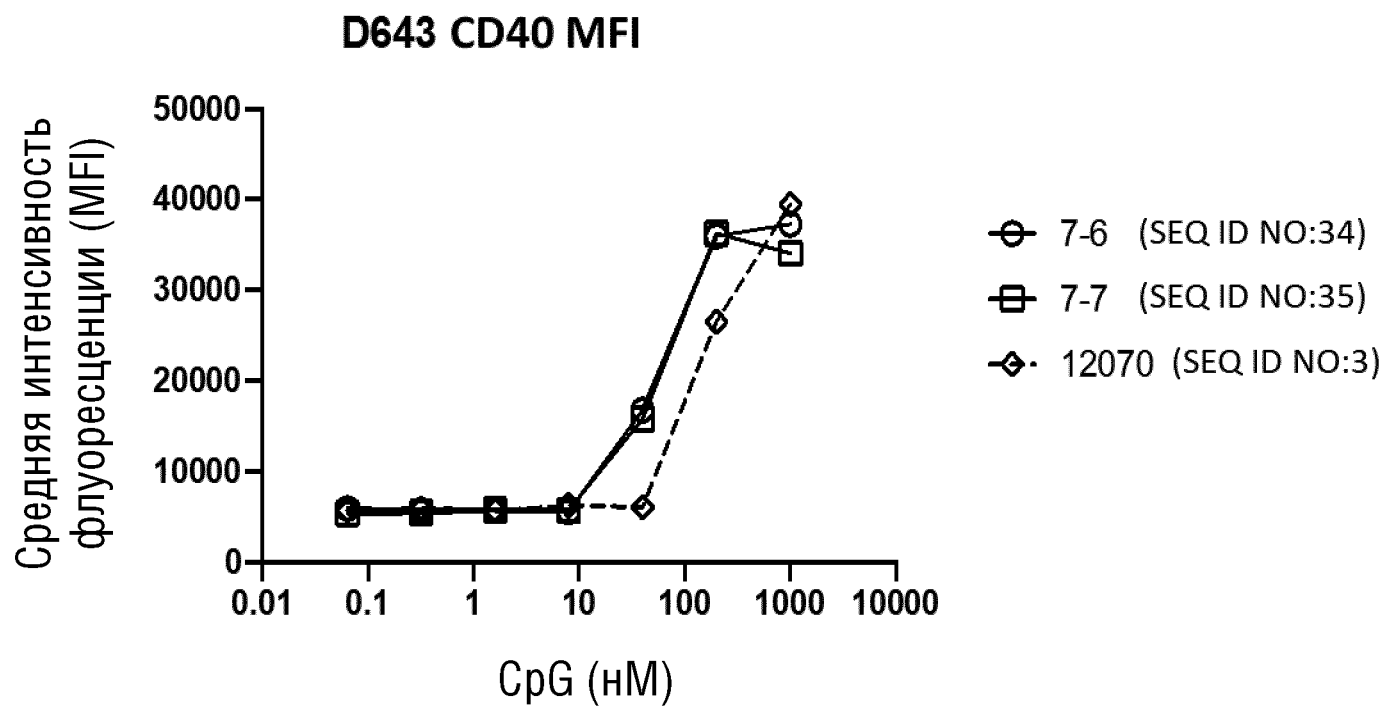
ФИГ.7А



ФИГ.7В



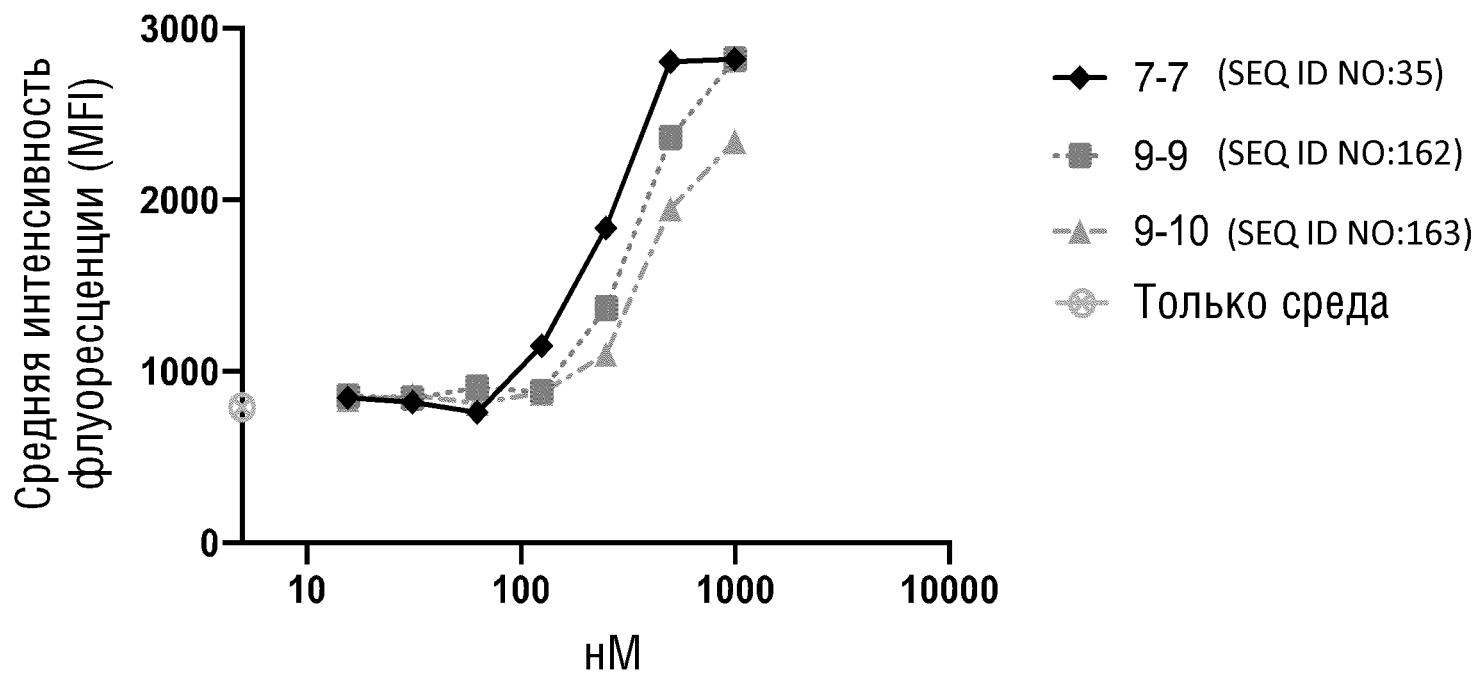
# ФИГ.7С





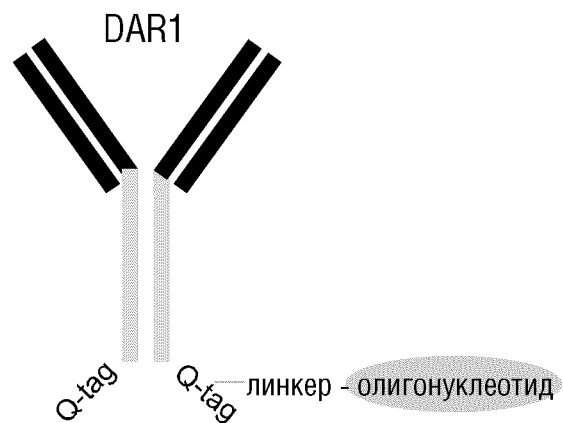
ФИГ.8

Активность свободных CpG CD19 CD86,  
среднее значение



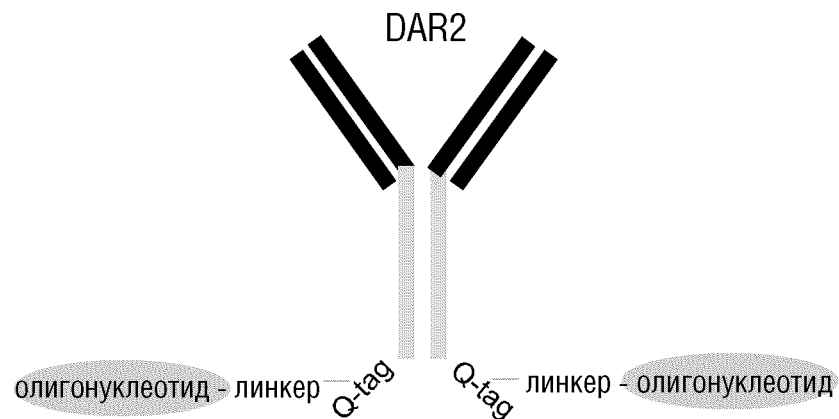
ФИГ.9А

Сконструированный Q-tag



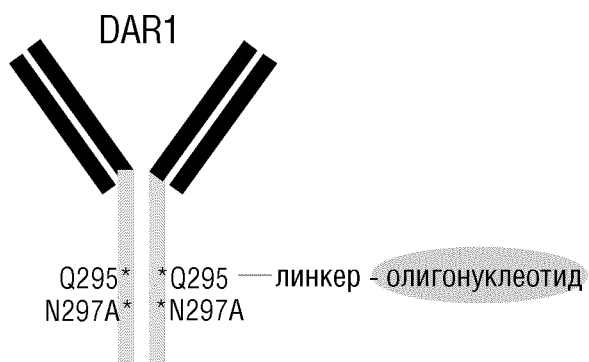
ФИГ.9В

Сконструированный Q-tag



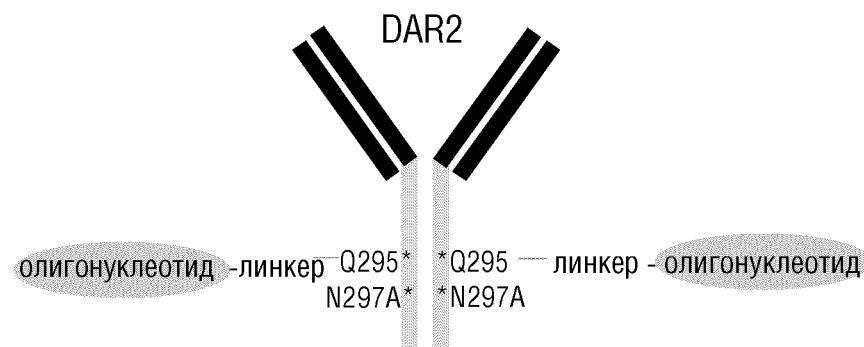
ФИГ.9С

Природный Q-tag



ФИГ.9D

Природный Q-tag

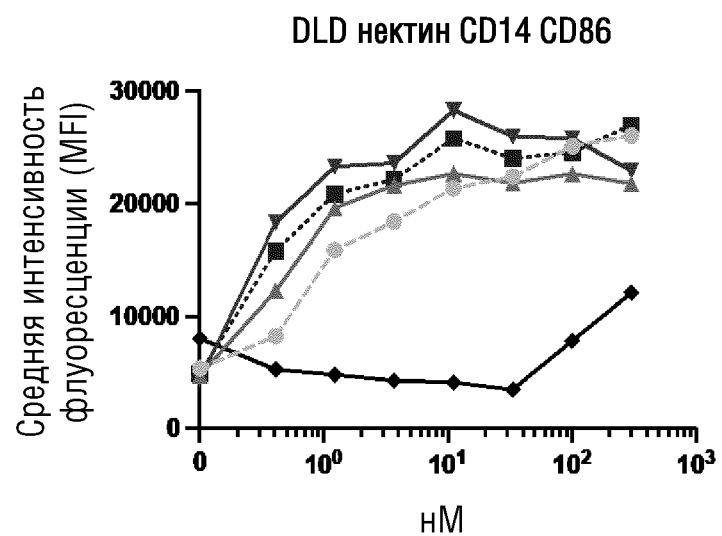


# ФИГ.10

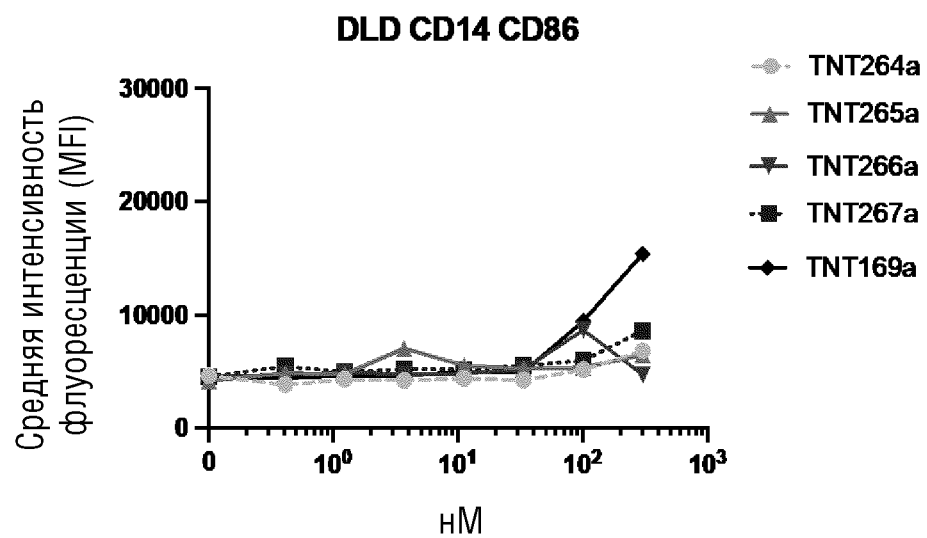
| % положительных |        | ПОКРЫТИЕ |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-----------------|--------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                 |        | TNT153   | TNT188 | TNT189 | TNT190 | TNT191 | TNT192 | TNT193 | TNT194 | TNT195 | TNT196 | TNT197 | TNT198 |
| ПРЕМИКС         | TNT212 | 5.6      | 10.1   | 3.1    | 1.5    | 3.0    | 2.2    | 3.7    | 21.2   | 20.7   | 1.8    | 2.7    | 1.9    |
|                 | TNT201 | 2.8      | 2.7    | 1.0    | 1.2    | 1.5    | 1.1    | 2.2    | 6.7    | 6.6    | 0.9    | 1.7    | 0.9    |
|                 | TNT202 | 3.6      | 12.8   | 4.3    | 0.8    | 4.8    | 3.1    | 3.0    | 27.9   | 24.7   | 2.8    | 7.8    | 2.5    |
|                 | TNT203 | 28.8     | 40.0   | 29.3   | 3.5    | 32.7   | 23.3   | 17.0   | 65.2   | 51.5   | 18.3   | 39.7   | 29.8   |
|                 | TNT204 | 4.2      | 9.2    | 3.9    | 0.7    | 4.5    | 2.9    | 1.9    | 18.7   | 15.2   | 2.6    | 6.7    | 2.2    |
|                 | TNT205 | 50.0     | 52.5   | 44.4   | 13.5   | 54.8   | 36.9   | 8.4    | 75.3   | 63.2   | 35.9   | 57.1   | 56.9   |
|                 | TNT206 | 7.7      | 20.0   | 10.5   | 0.5    | 11.4   | 6.0    | 3.1    | 43.1   | 35.8   | 5.5    | 14.3   | 5.4    |
|                 | TNT207 | 2.2      | 7.5    | 2.4    | 0.3    | 2.5    | 1.5    | 1.6    | 18.4   | 18.3   | 1.3    | 3.4    | 1.0    |
|                 | TNT208 | 3.5      | 12.7   | 4.3    | 0.3    | 5.3    | 2.3    | 2.4    | 26.4   | 23.1   | 2.0    | 5.8    | 2.1    |
|                 | TNT209 | 26.2     | 43.7   | 26.7   | 3.4    | 30.4   | 20.5   | 5.1    | 66.5   | 56.2   | 17.8   | 37.2   | 26.0   |
|                 | TNT210 | 4.0      | 8.0    | 2.7    | 0.3    | 2.4    | 1.1    | 2.1    | 11.0   | 16.3   | 1.5    | 2.6    | 0.8    |
| TNT211          | 22.2   | 35.4     | 27.0   | 2.4    | 24.6   | 17.5   | 6.0    | 46.1   | 46.9   | 13.8   | 32.4   | 19.5   |        |

ФИГ.11

Нектин-4-положительные

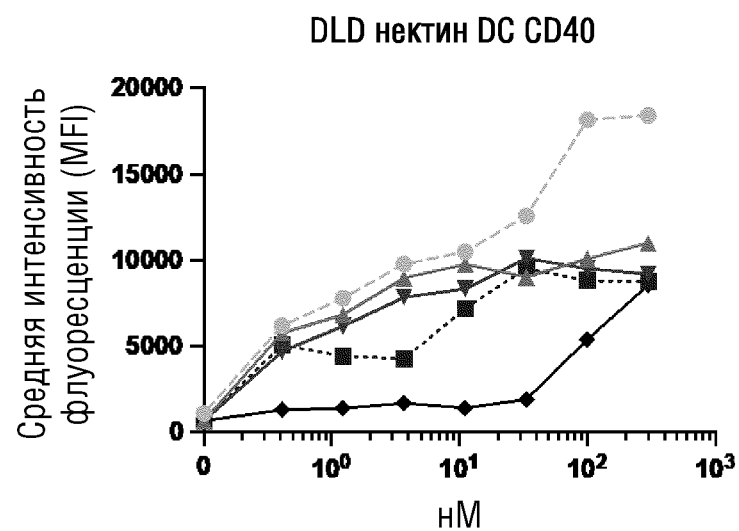


Нектин-4-отрицательные

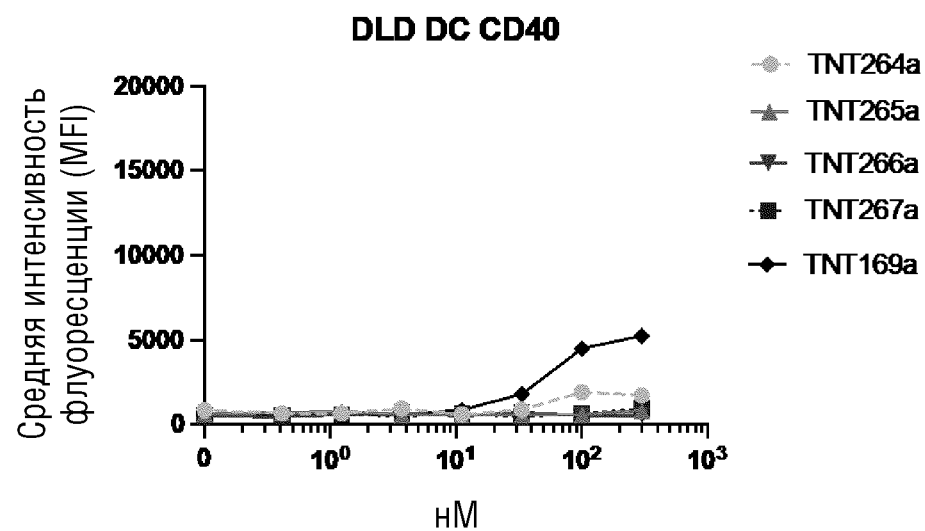


ФИГ.12

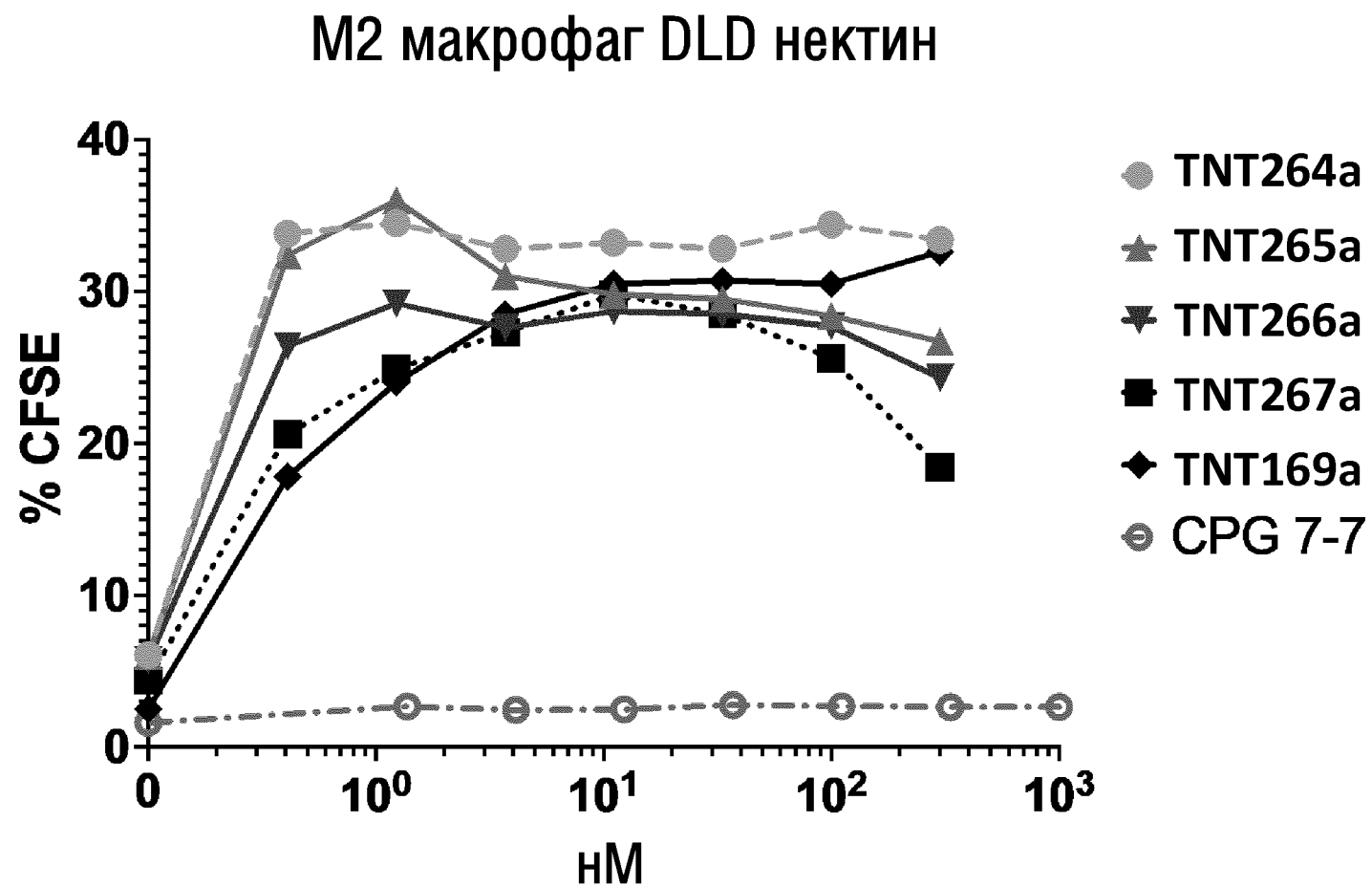
Нектин-4-положительные



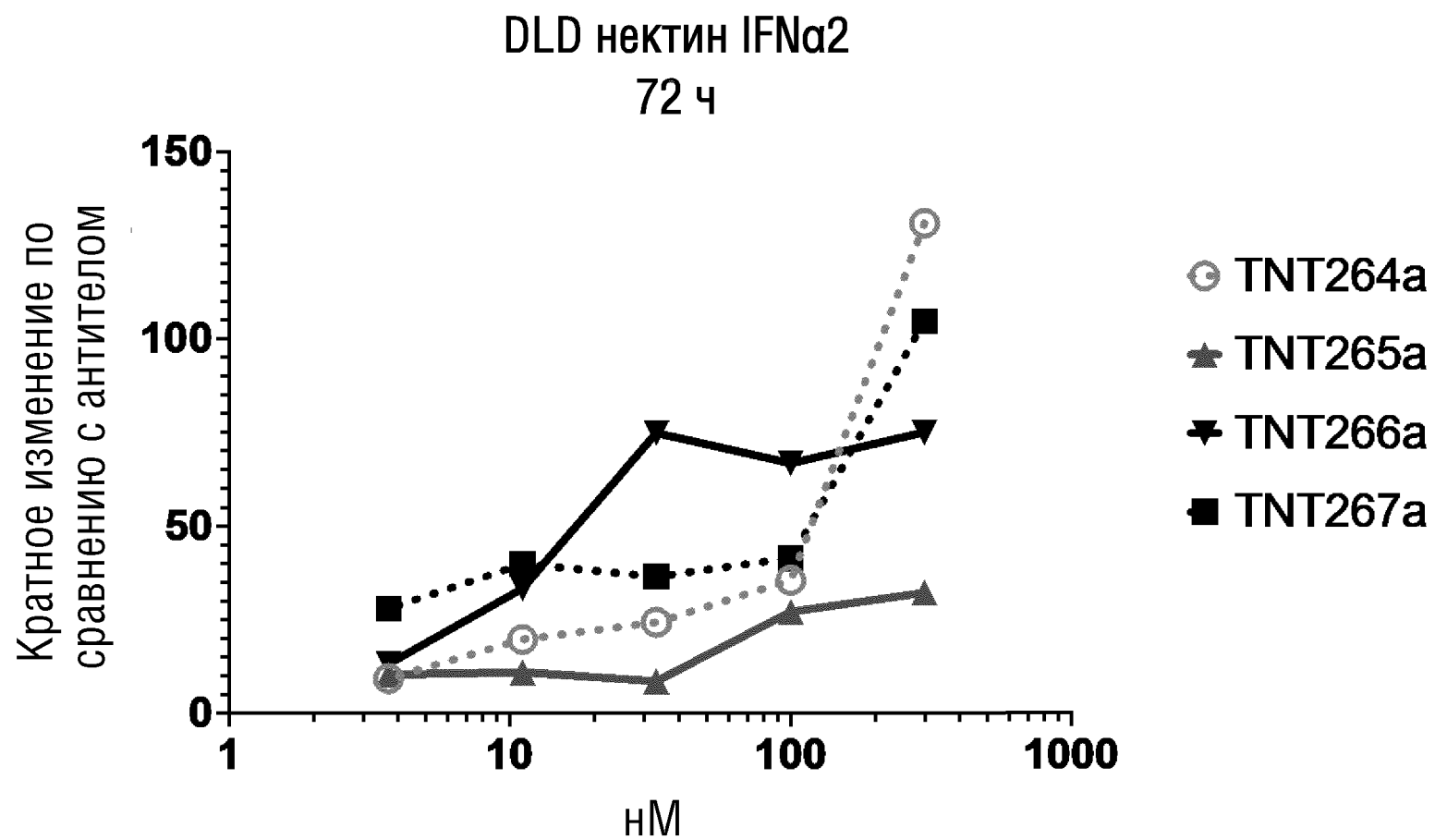
Нектин-4-отрицательные



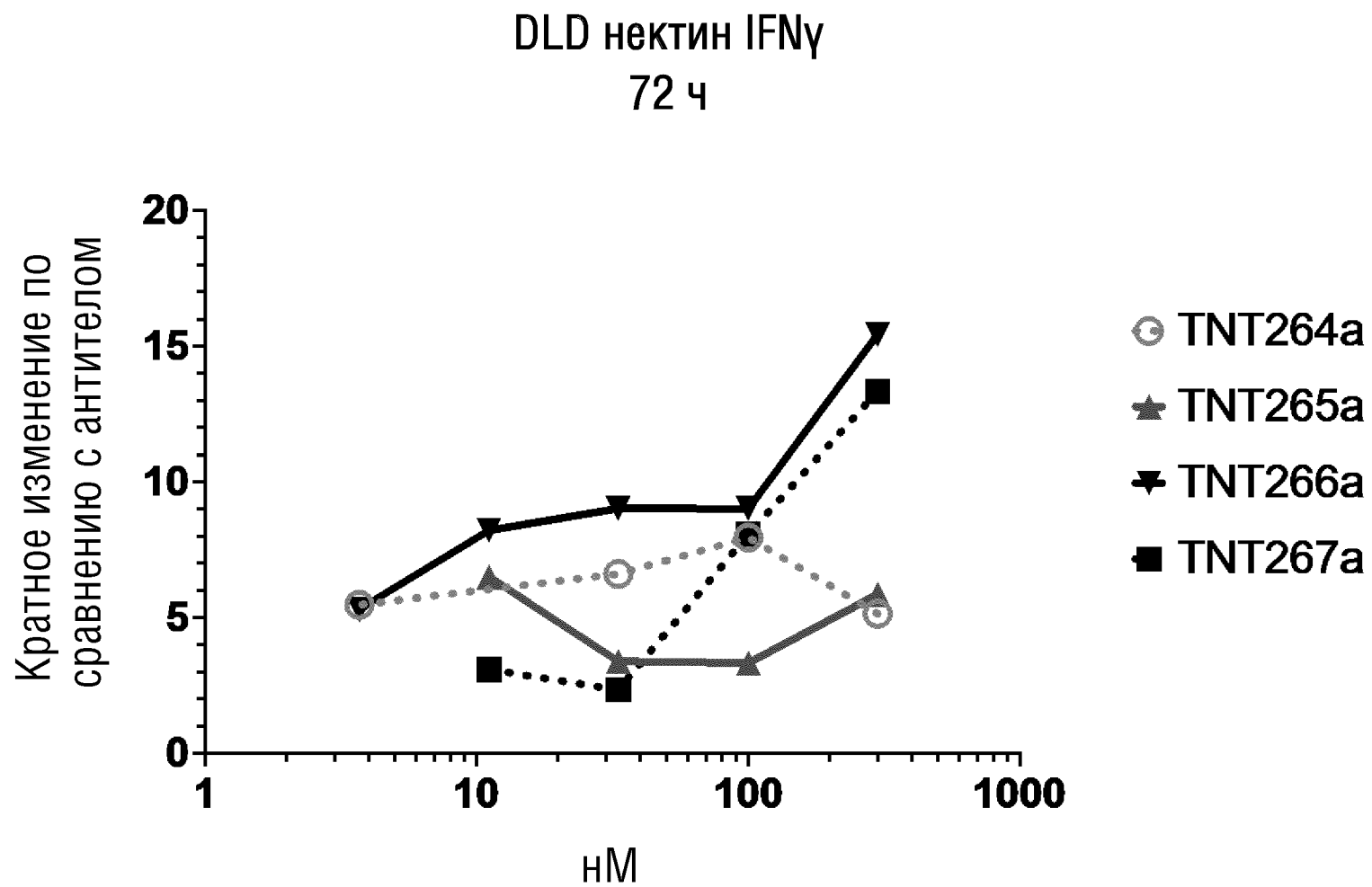
ФИГ.13



ФИГ.14А

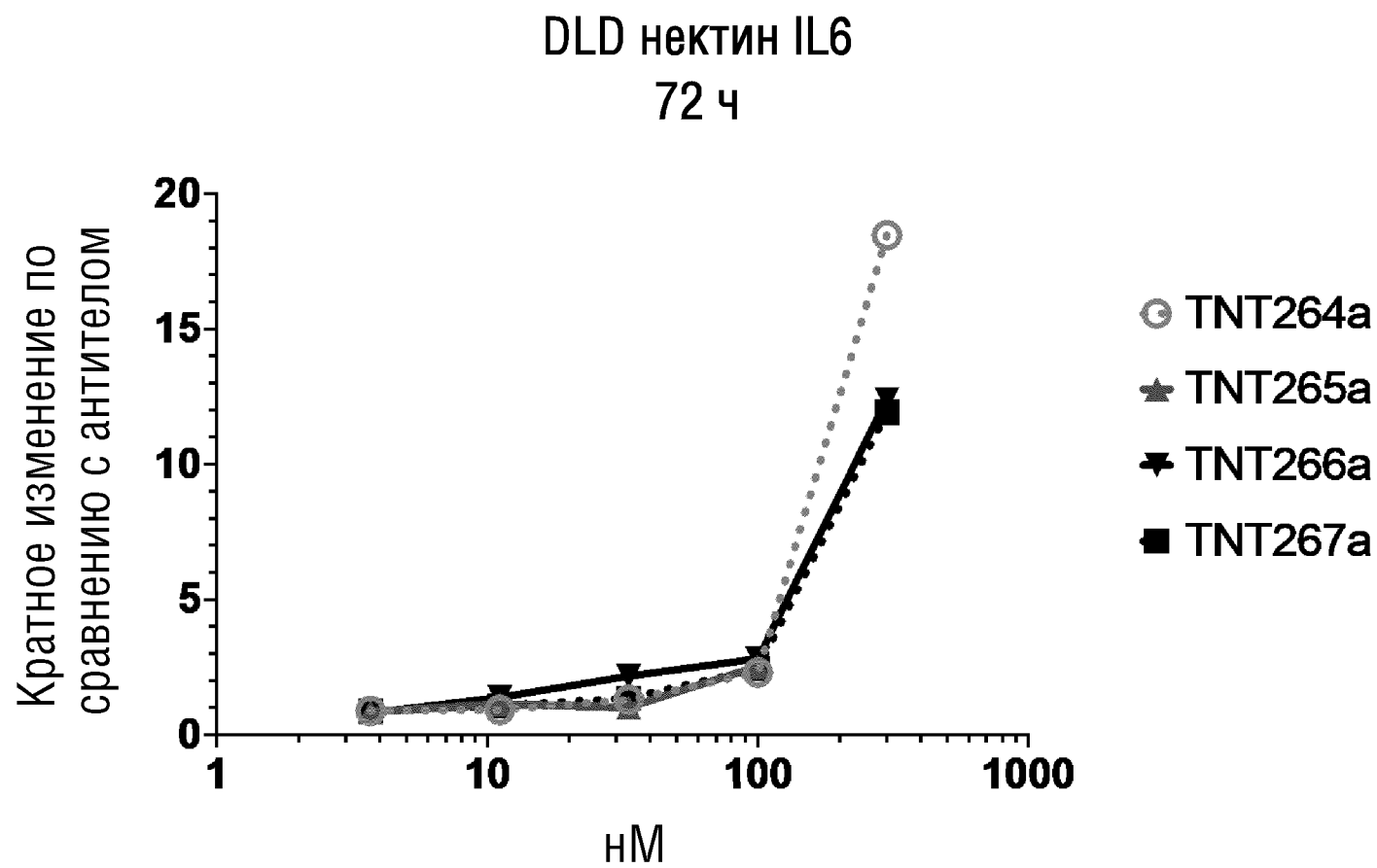


ФИГ.14В

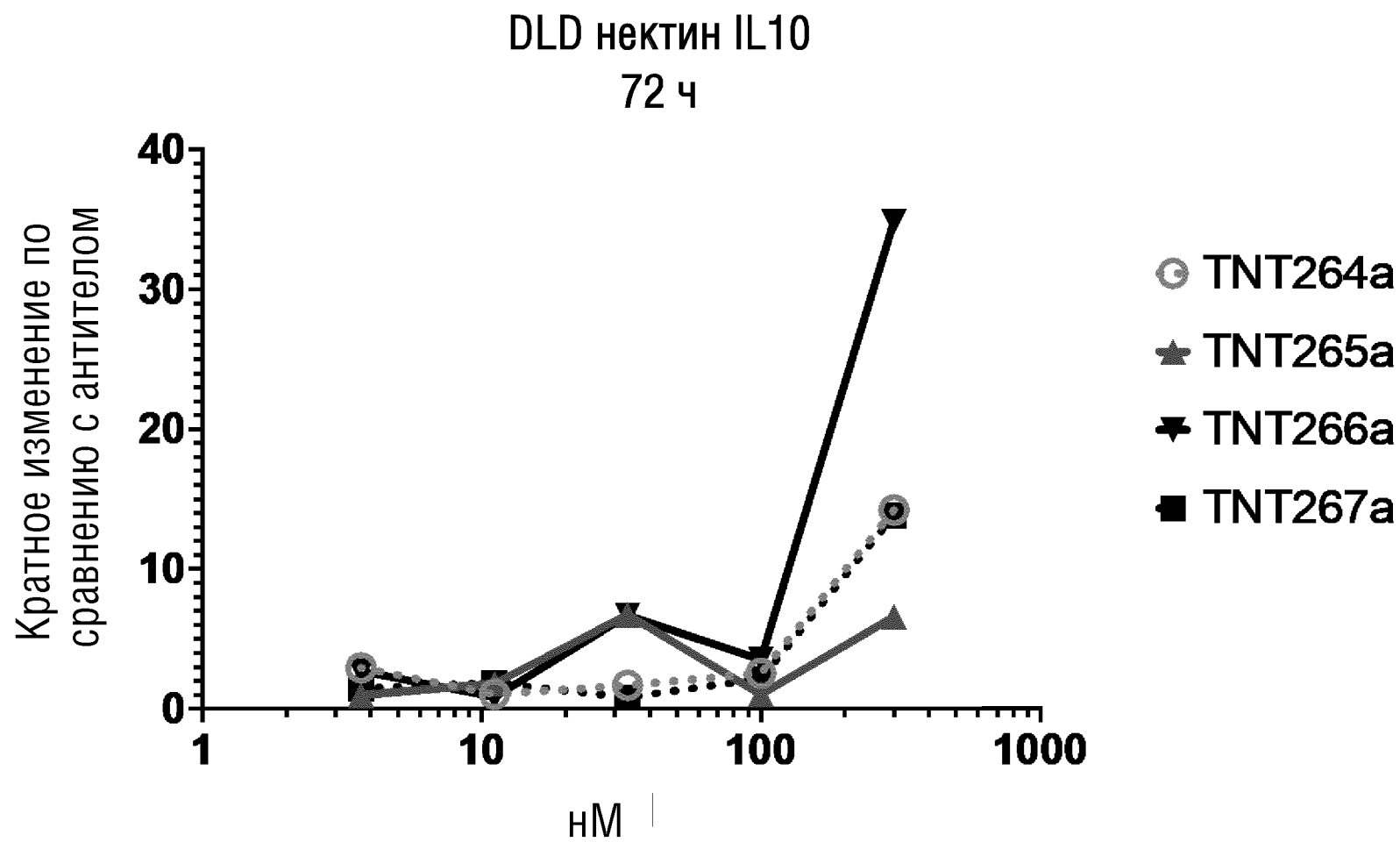




ФИГ.14С



ФИГ.14D

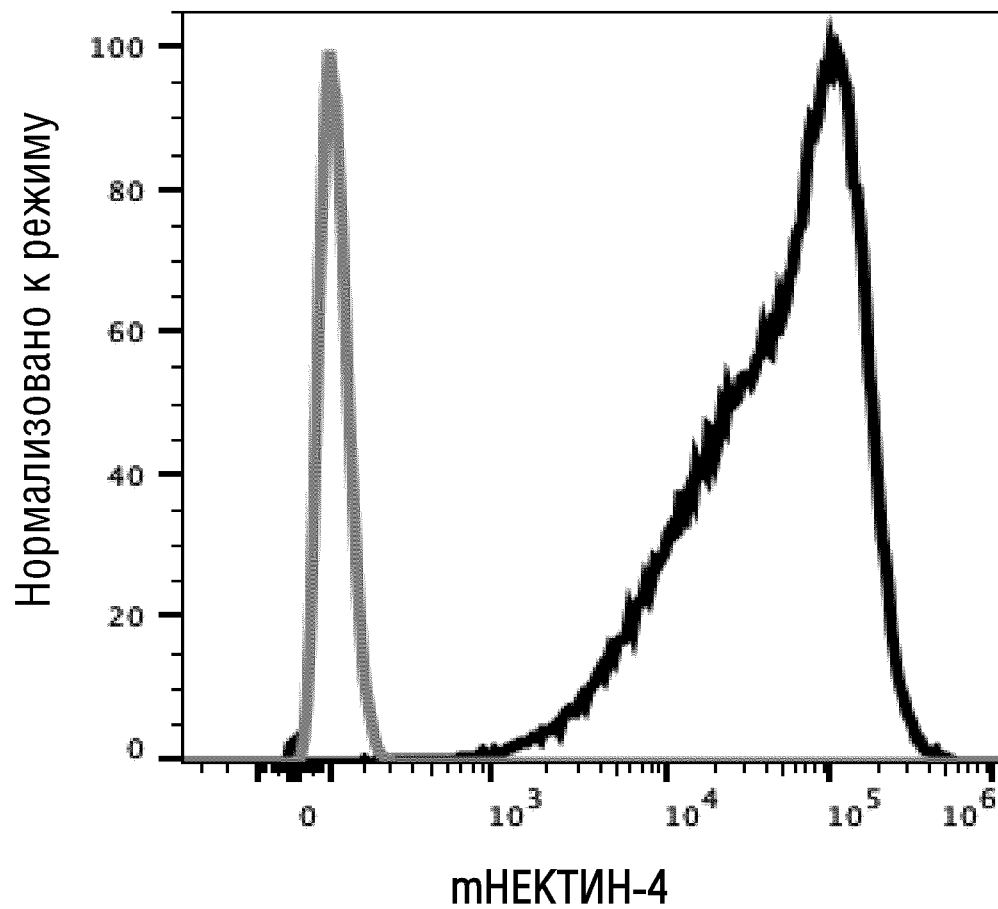


ФИГ.15

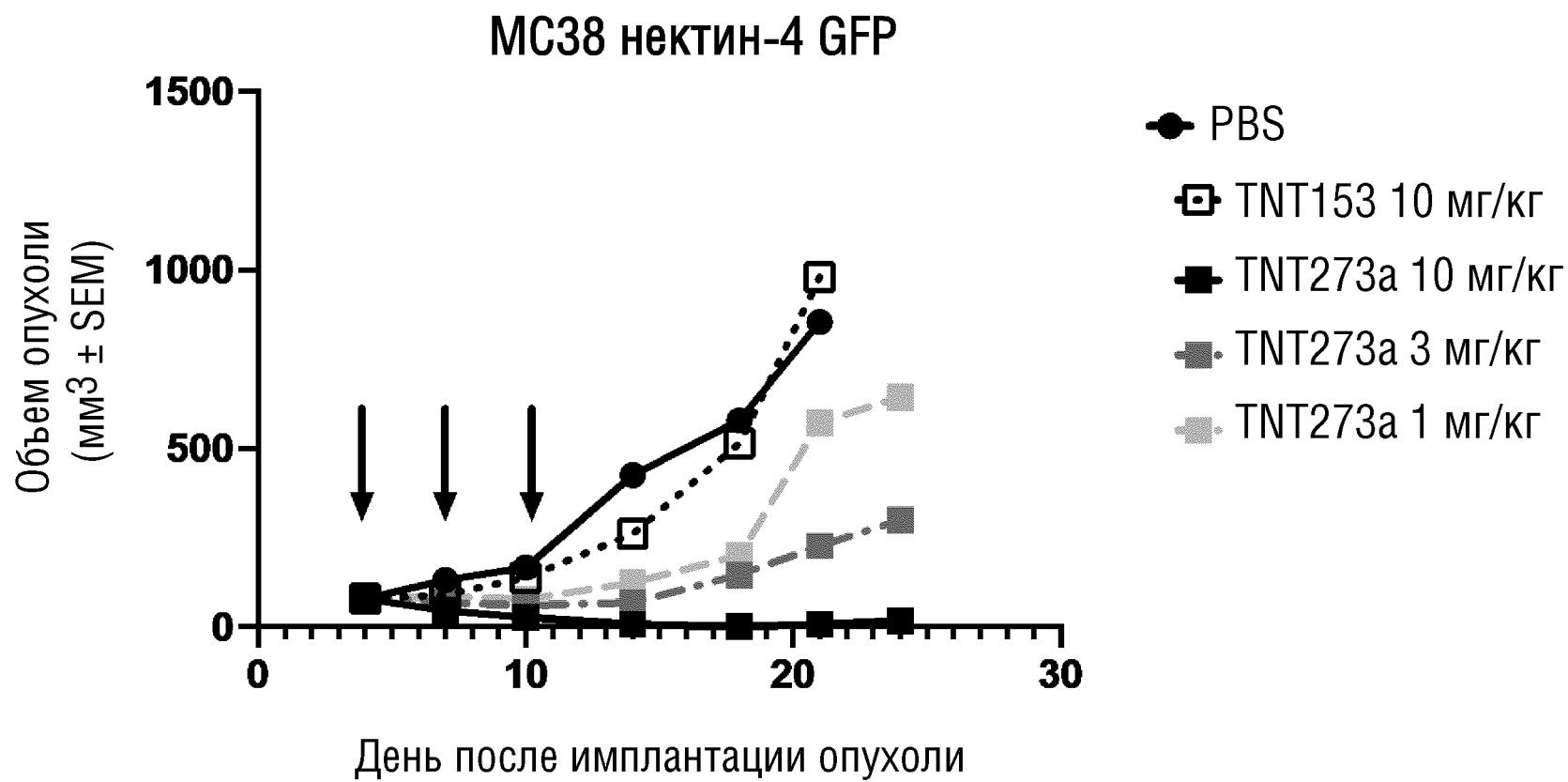


ФИГ.16А

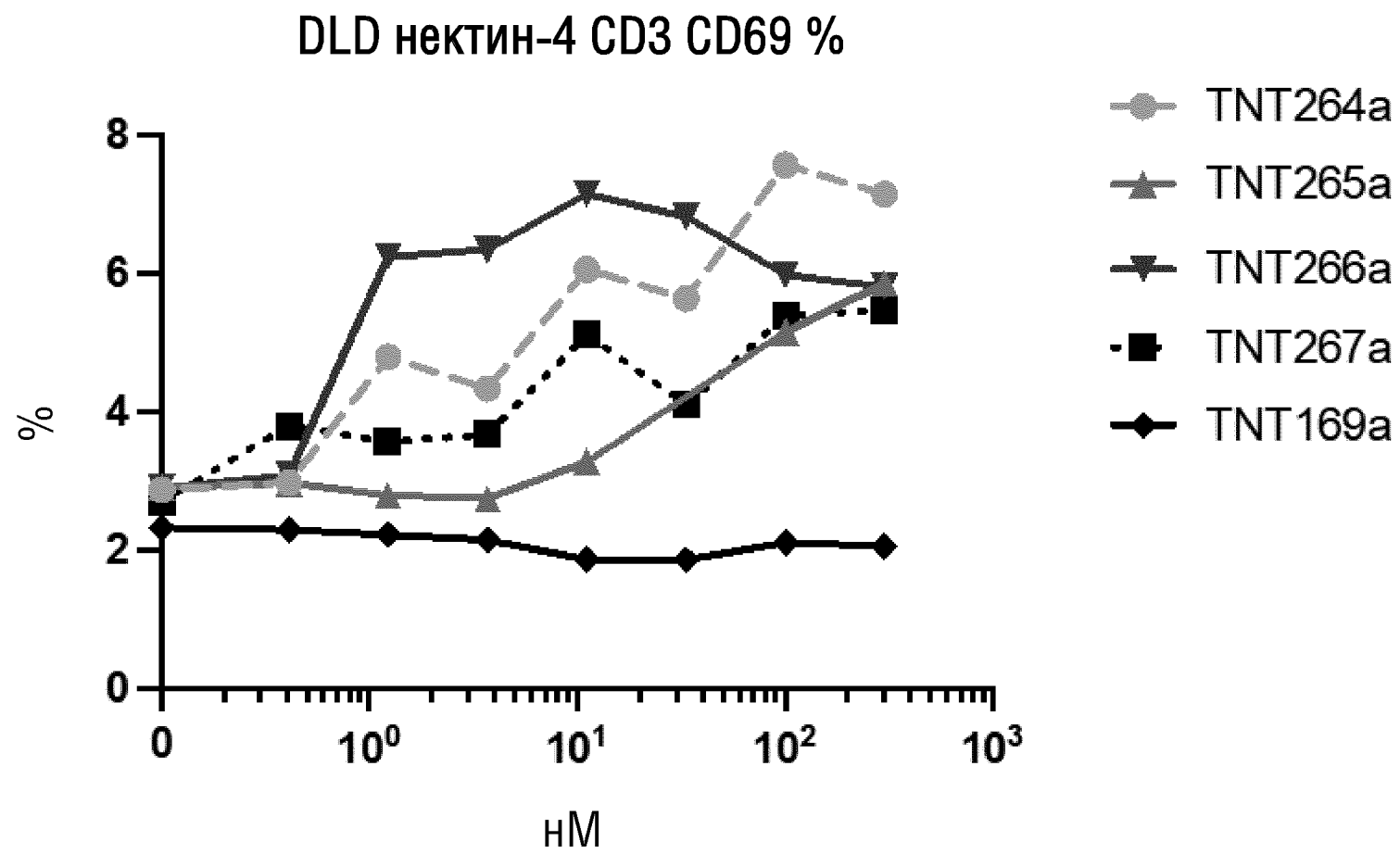
МС38 нектин-4



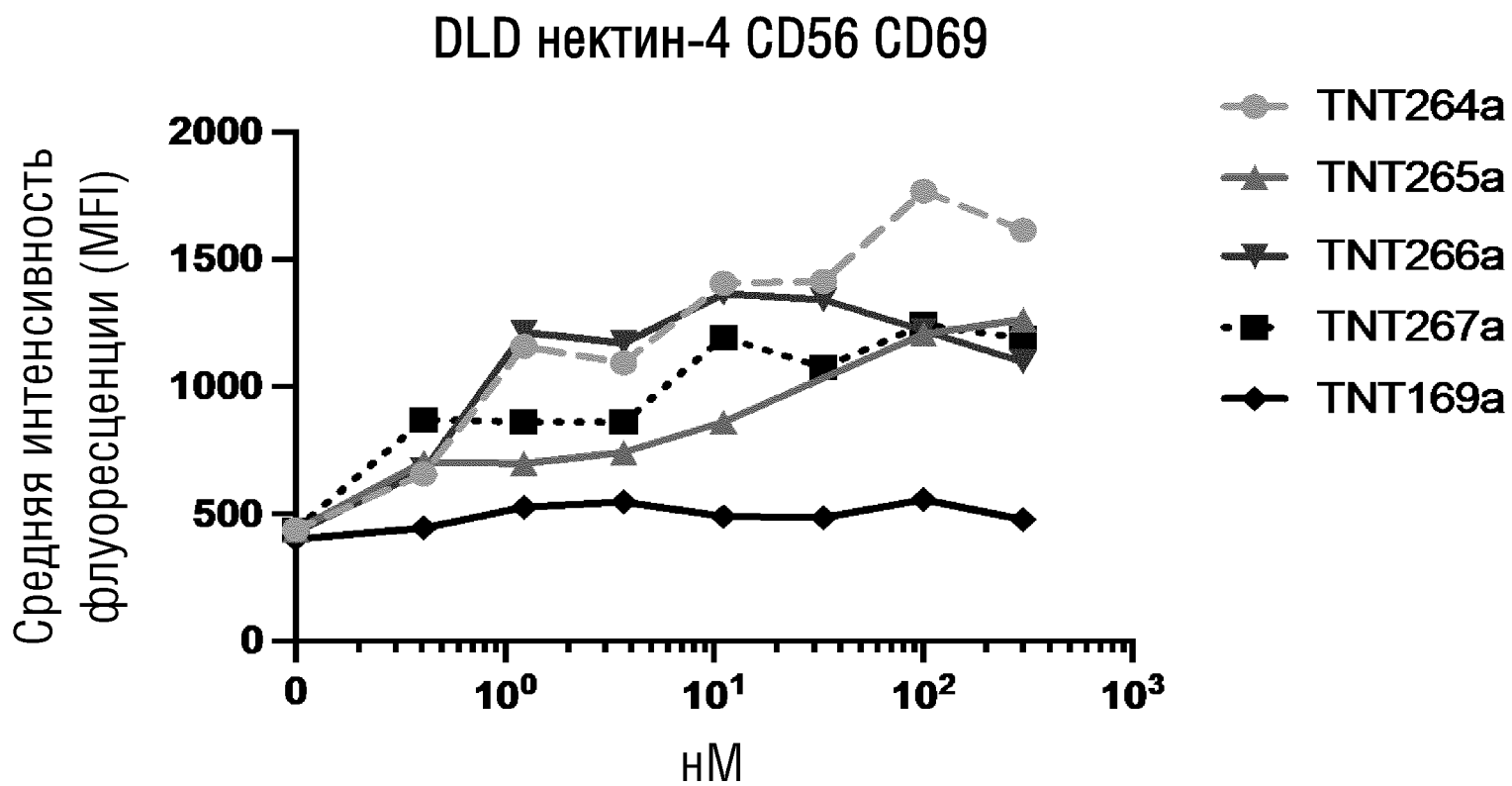
ФИГ.16В



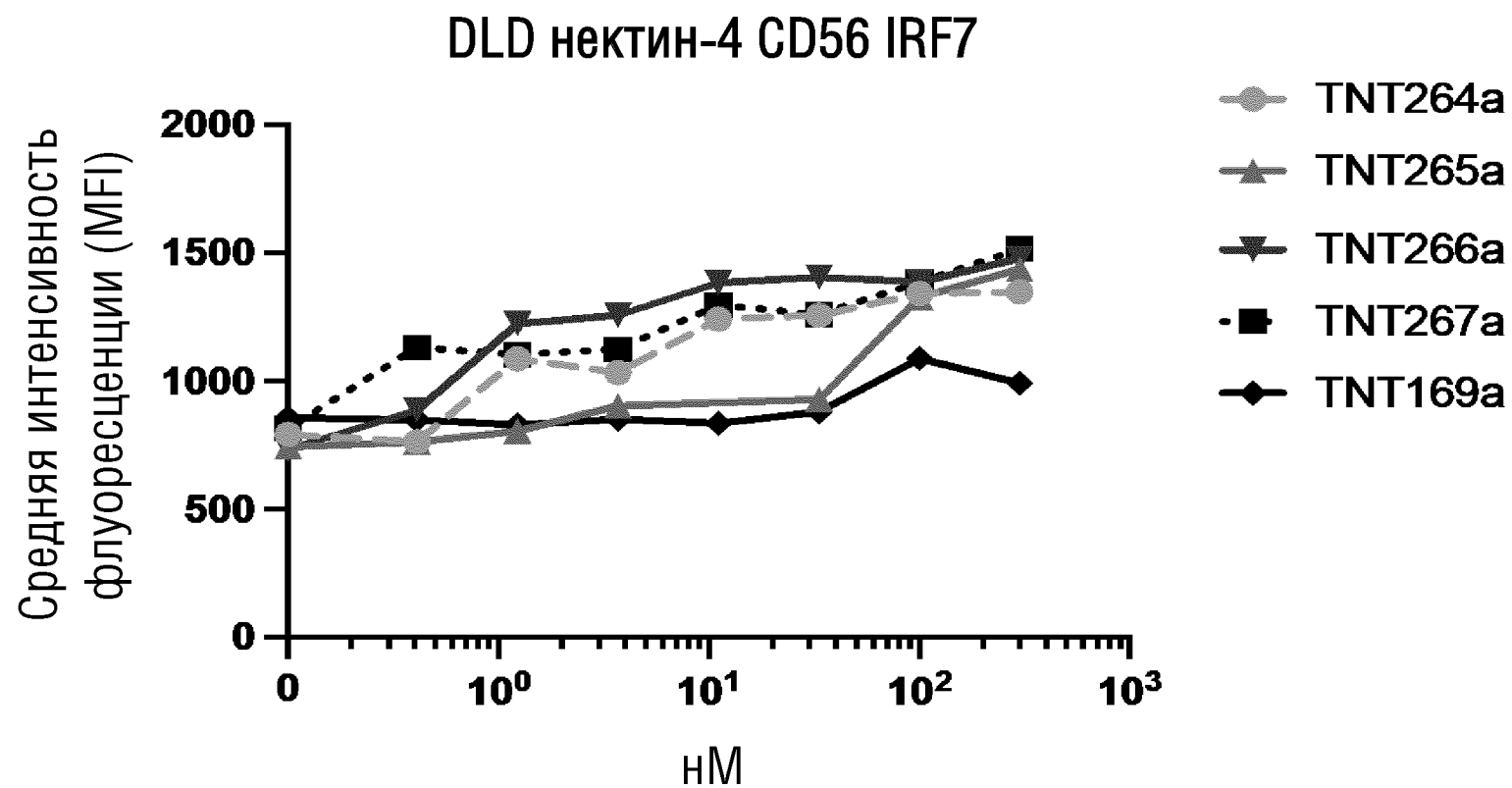
ФИГ.17



ФИГ.18



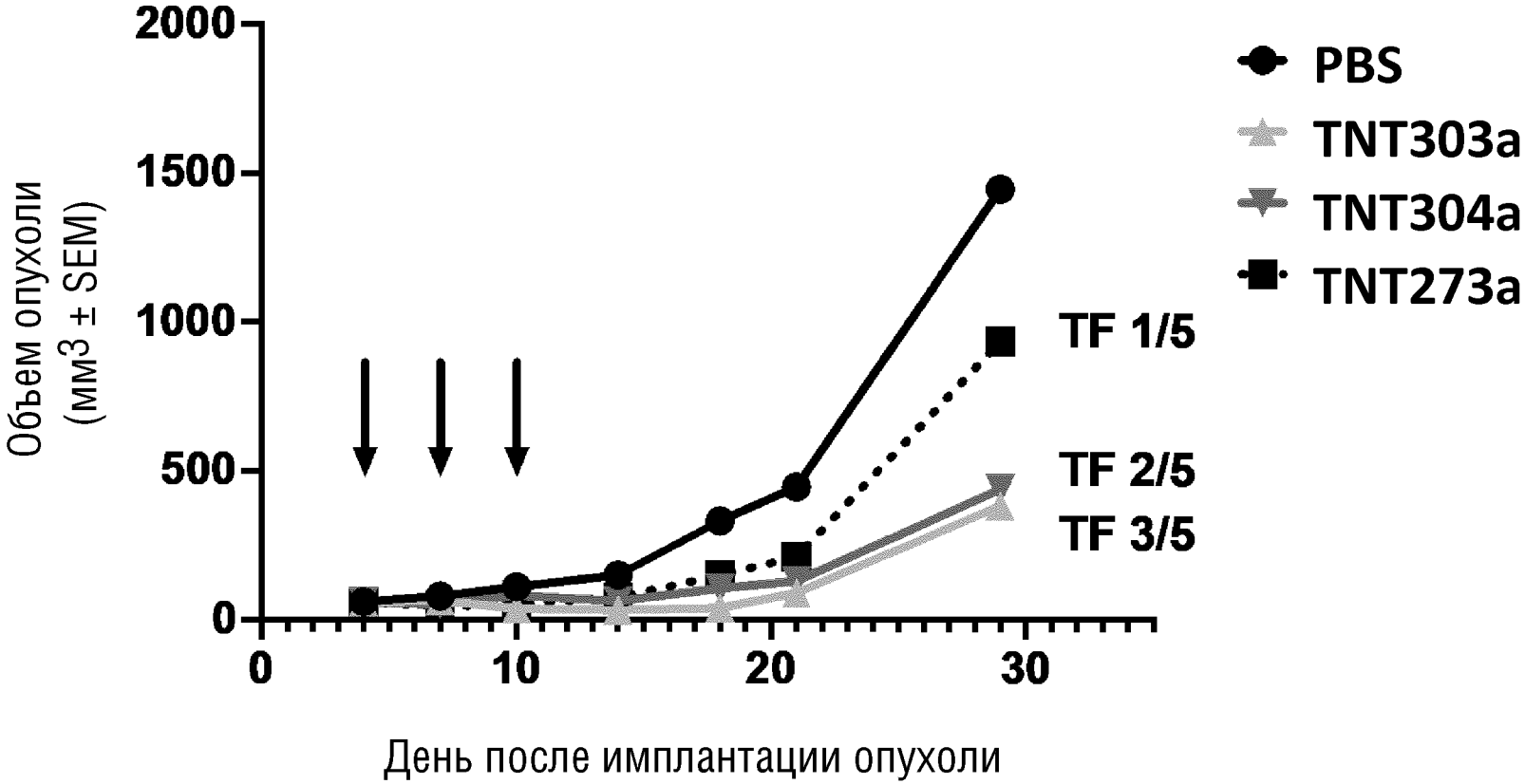
ФИГ.19



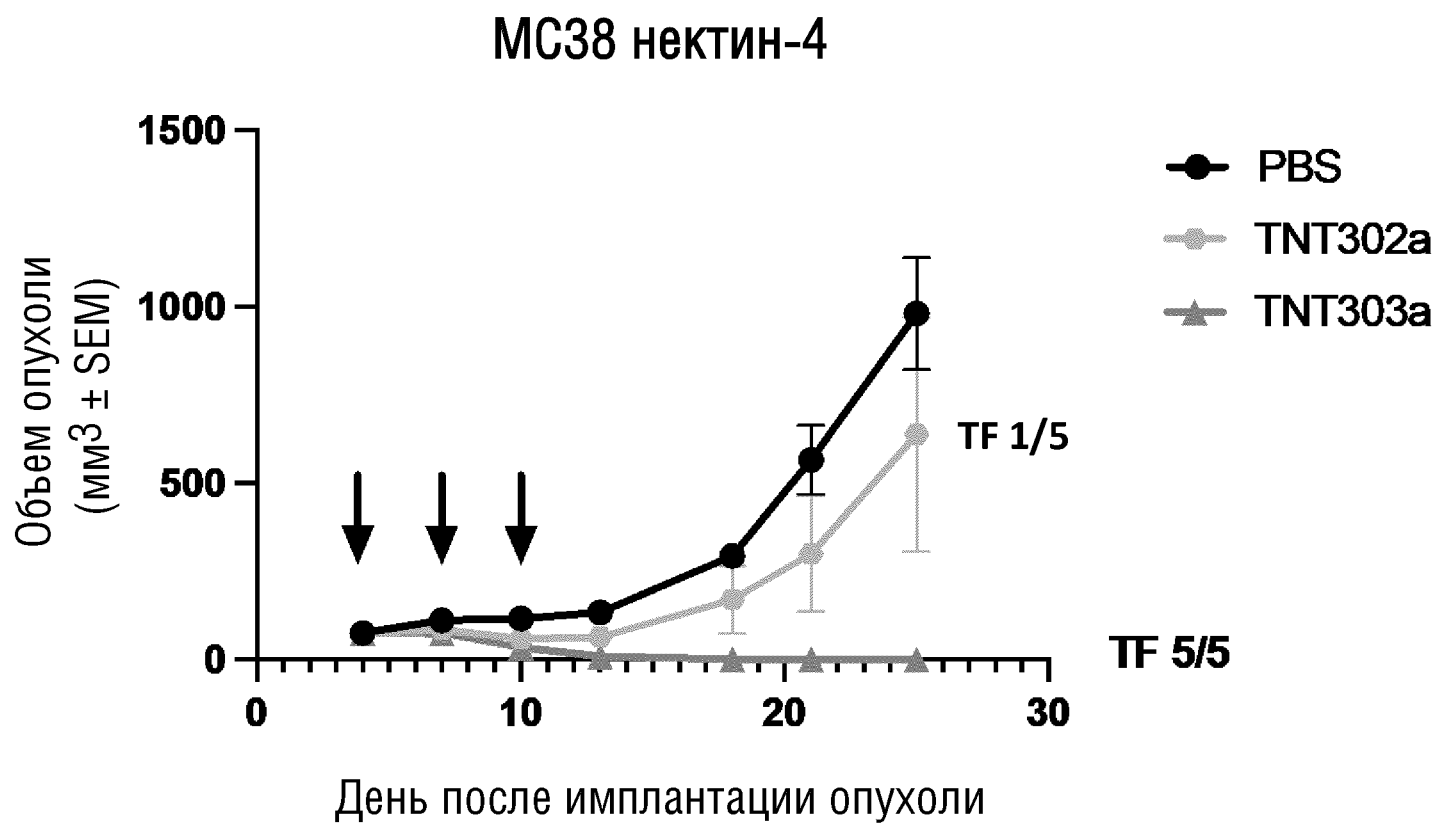


ФИГ.20А

МС38 нектин-4 GFP

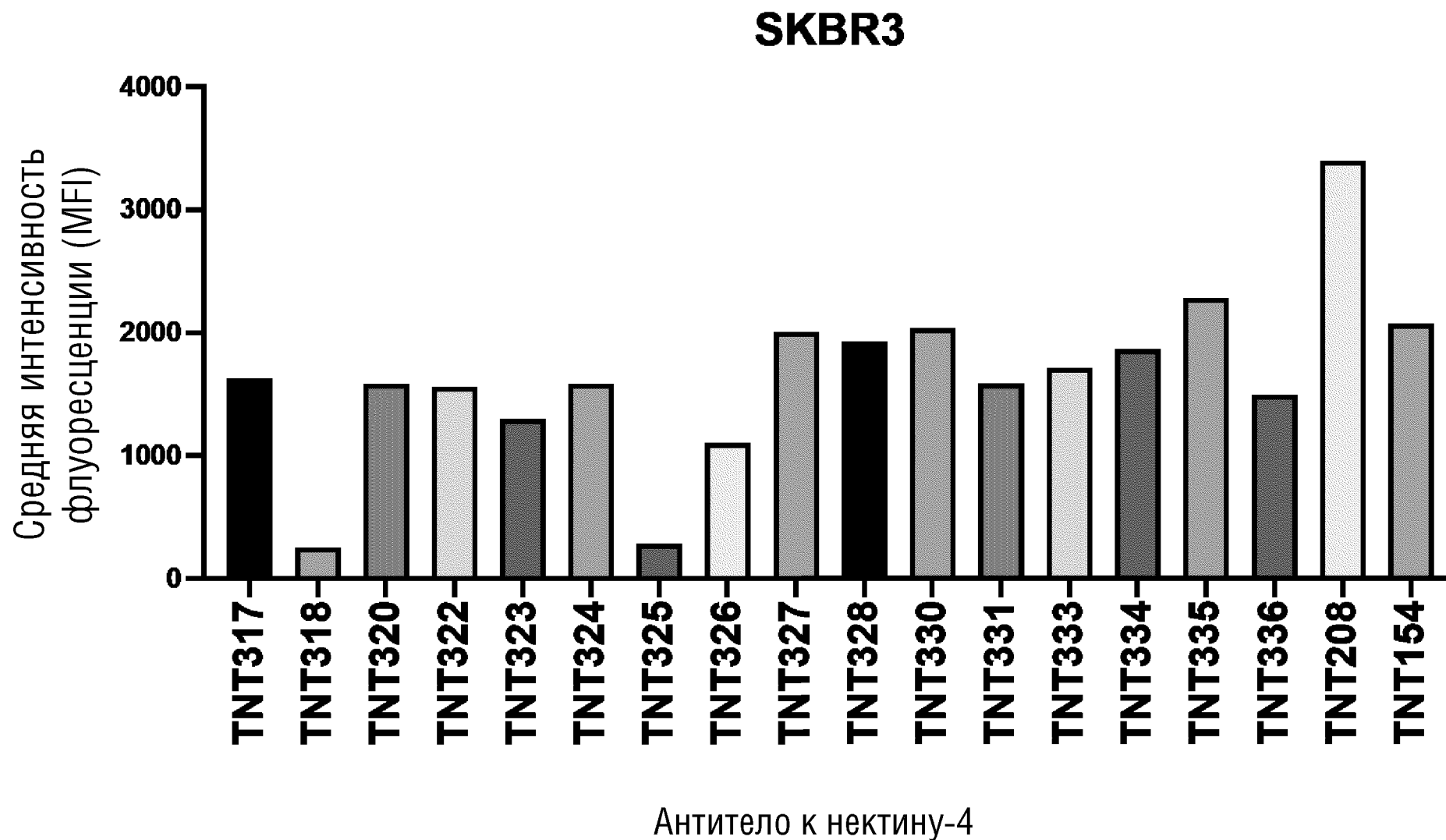


ФИГ.20В

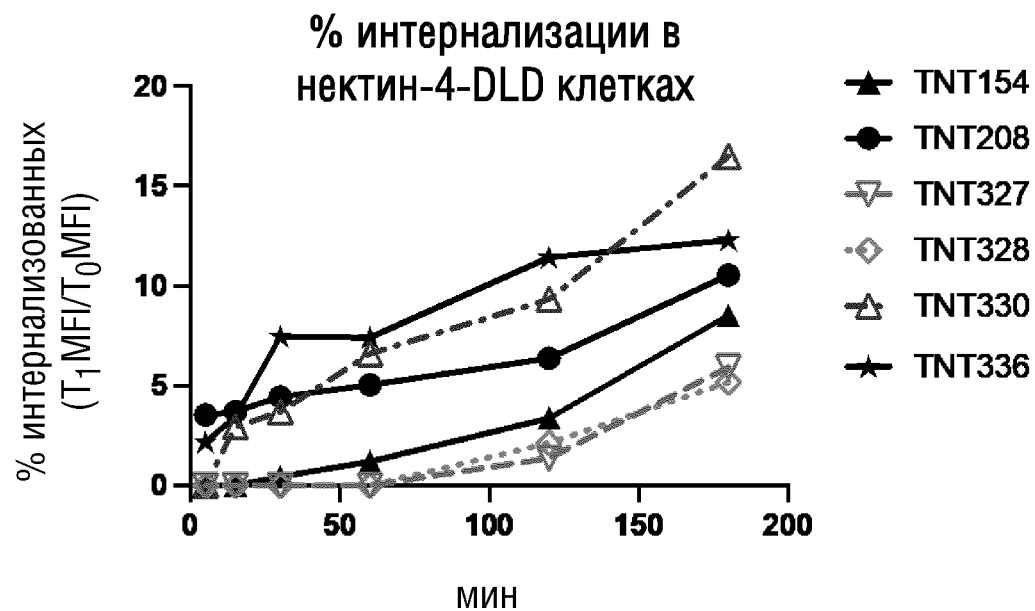
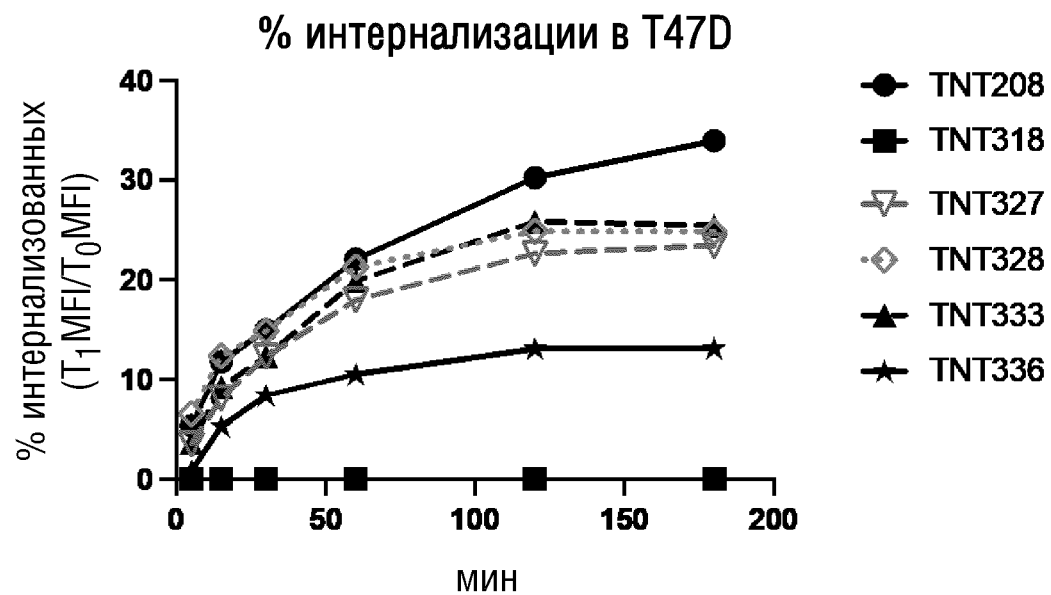


30/52

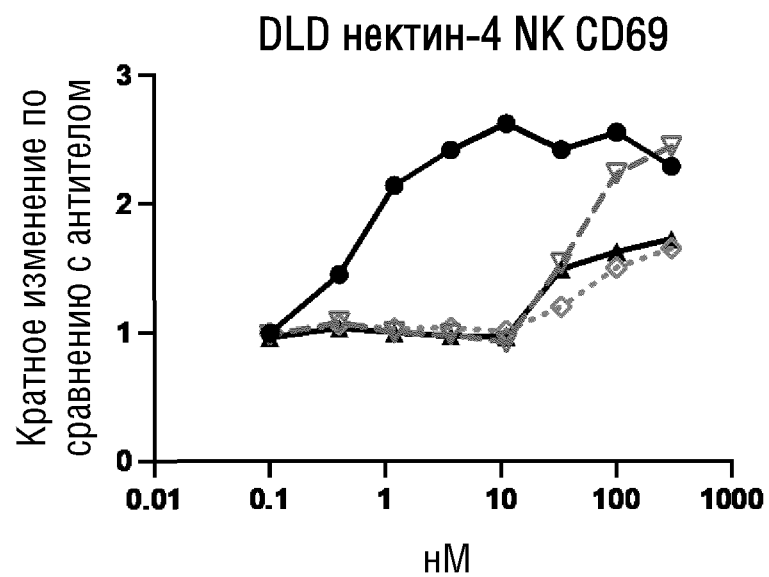
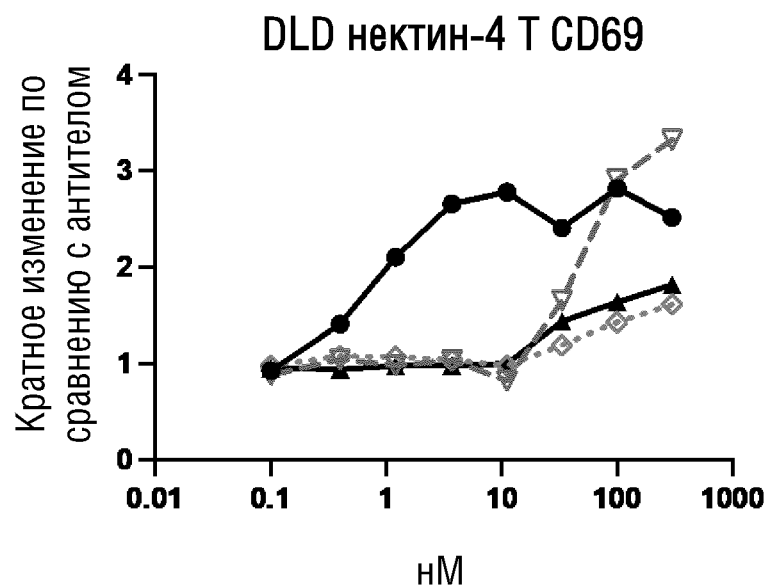
ФИГ.21



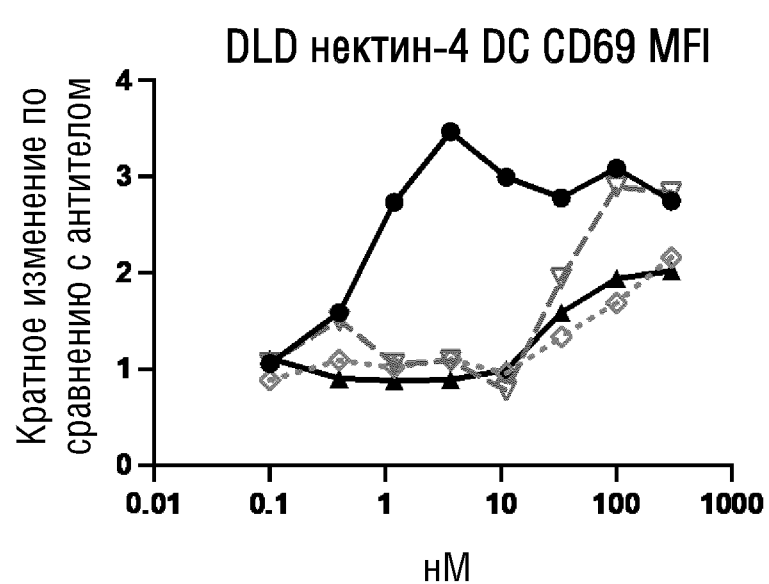
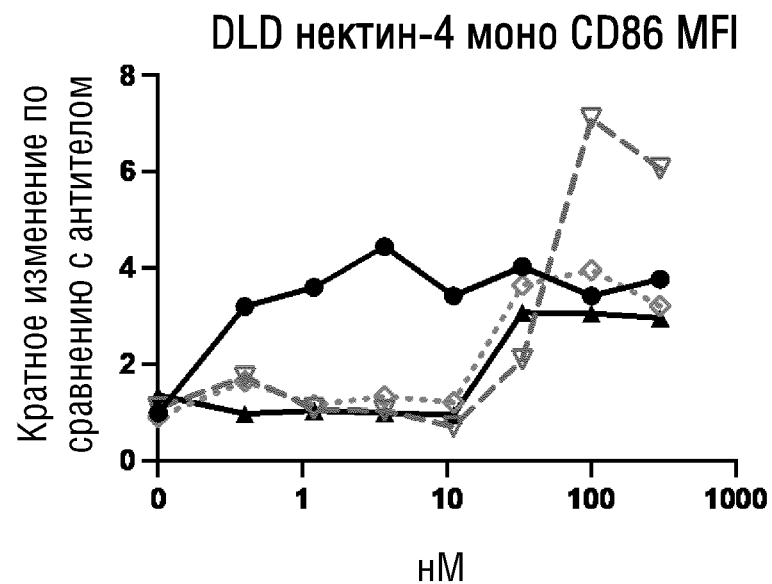
ФИГ.22



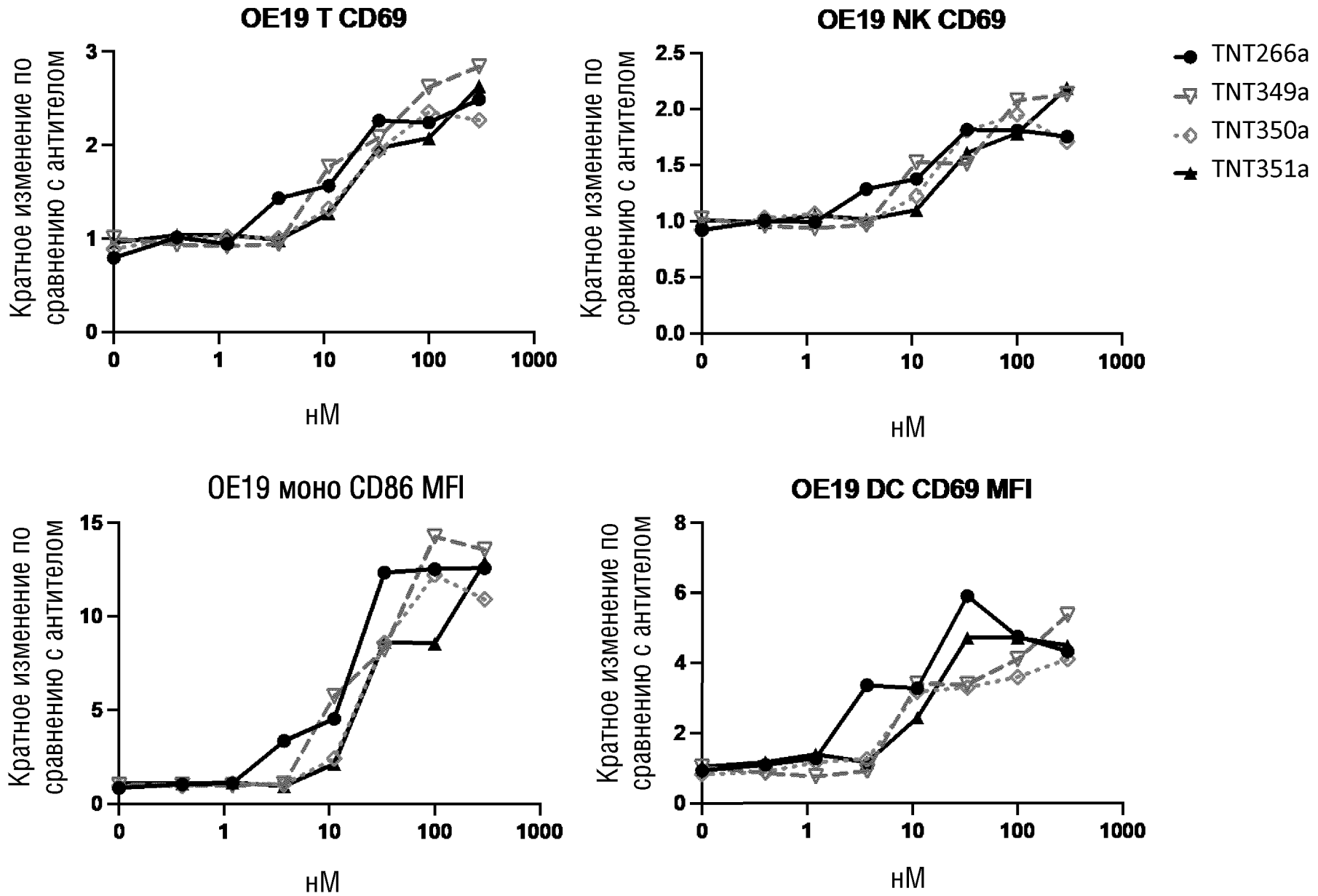
ФИГ.23



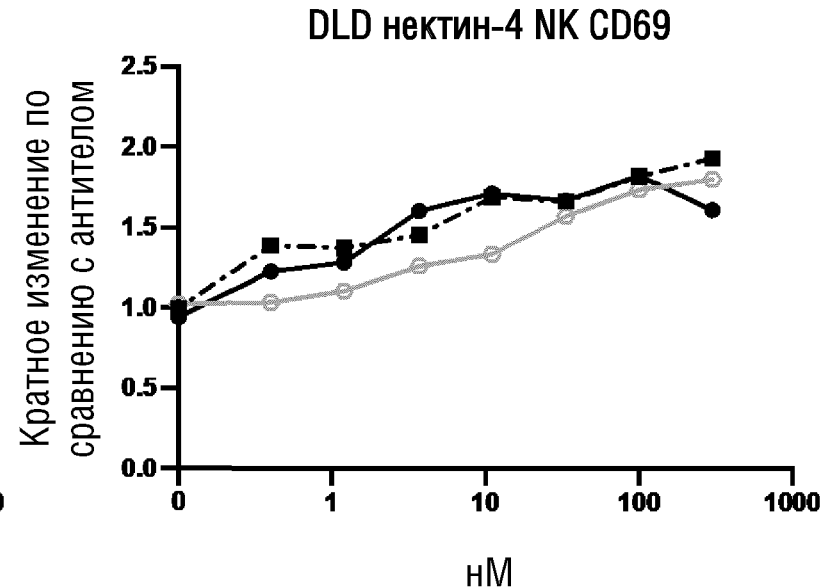
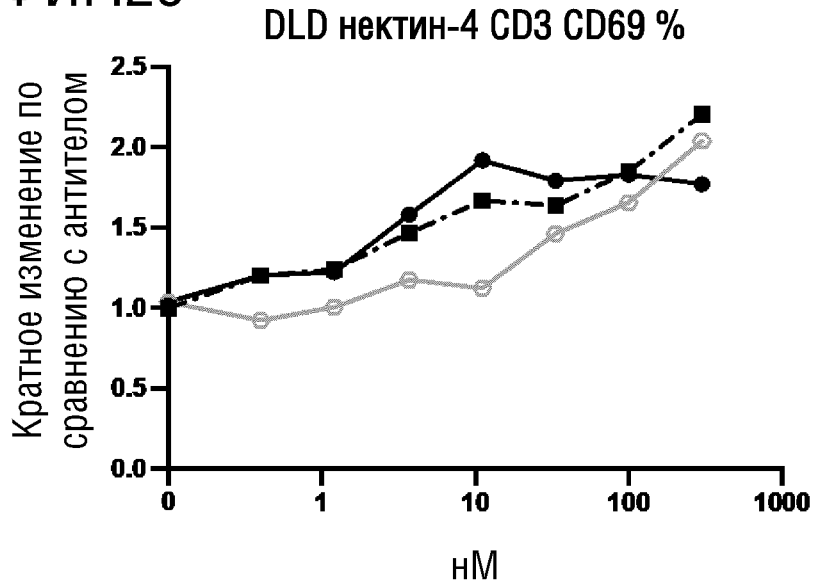
- TNT266a
- ▽ TNT349a
- ◇ TNT350a
- ▲ TNT351a



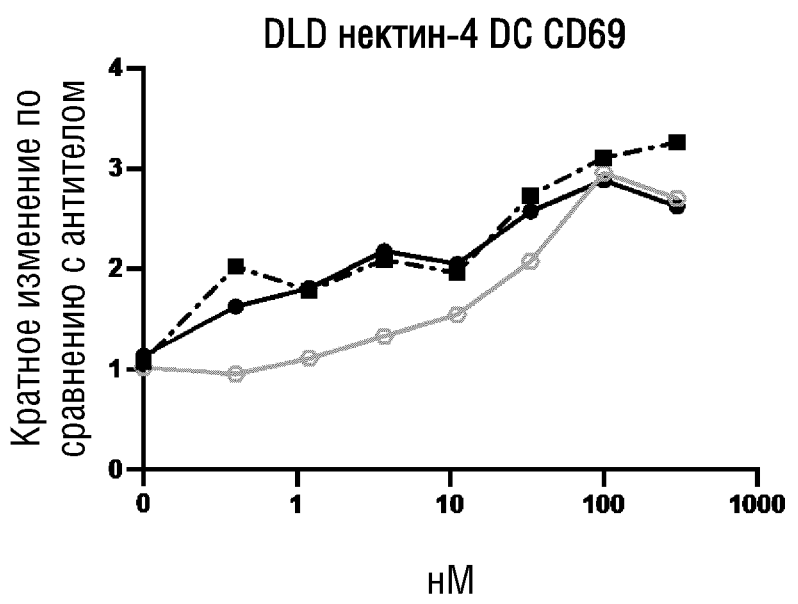
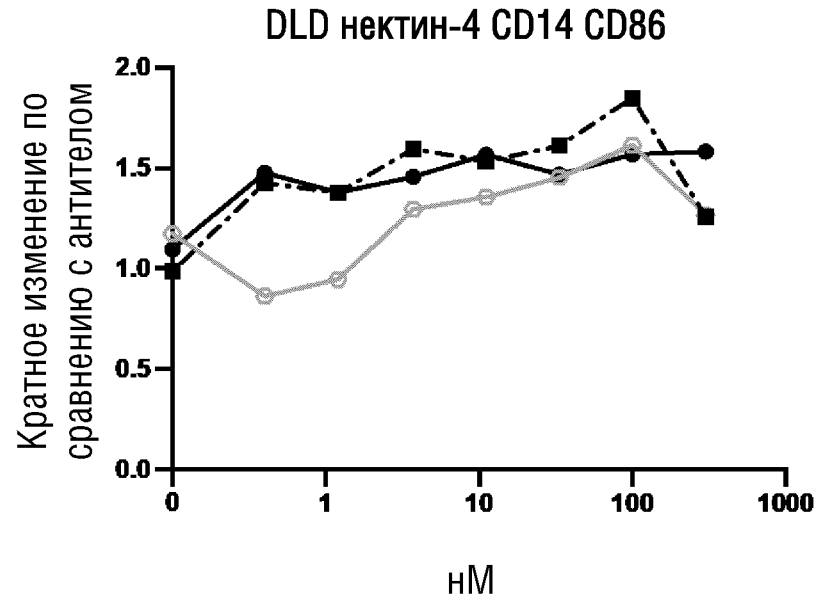
ФИГ.24



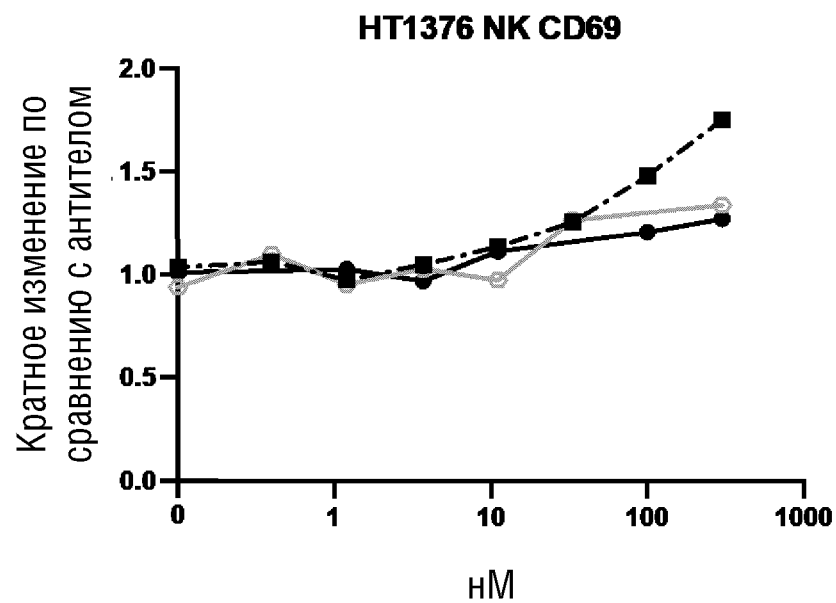
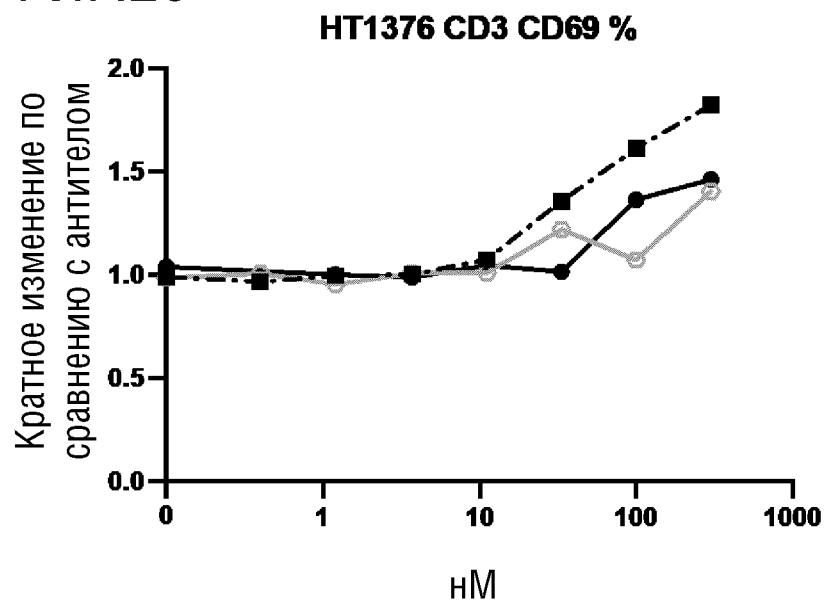
ФИГ.25



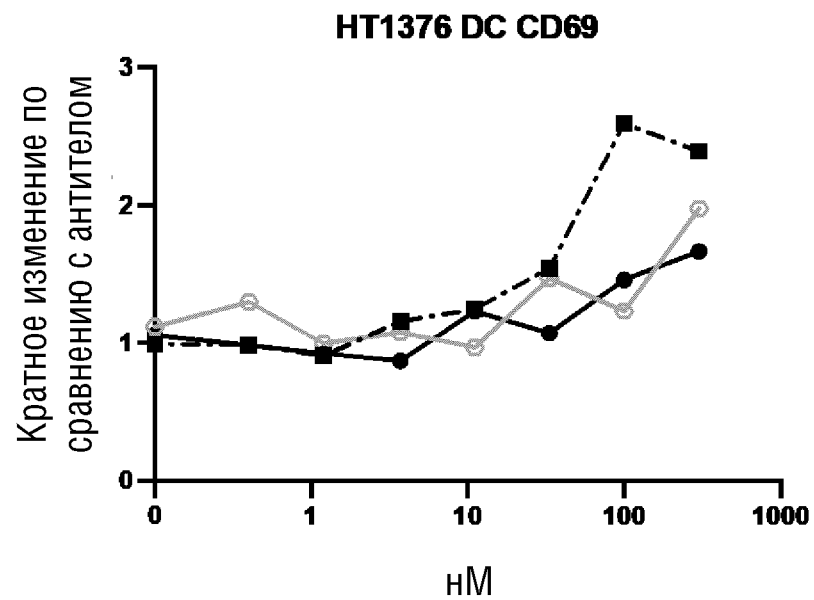
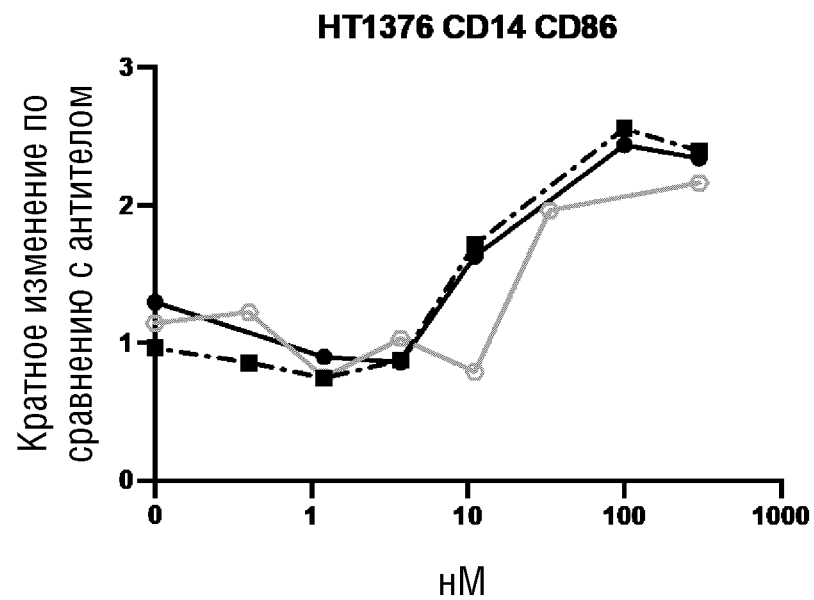
- TNT354a
- TNT358a
- TNT266a



ФИГ.26

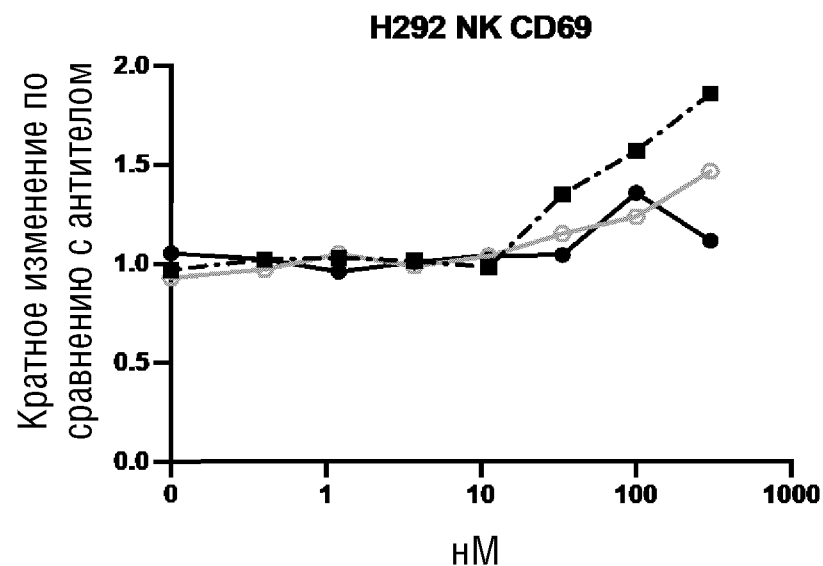
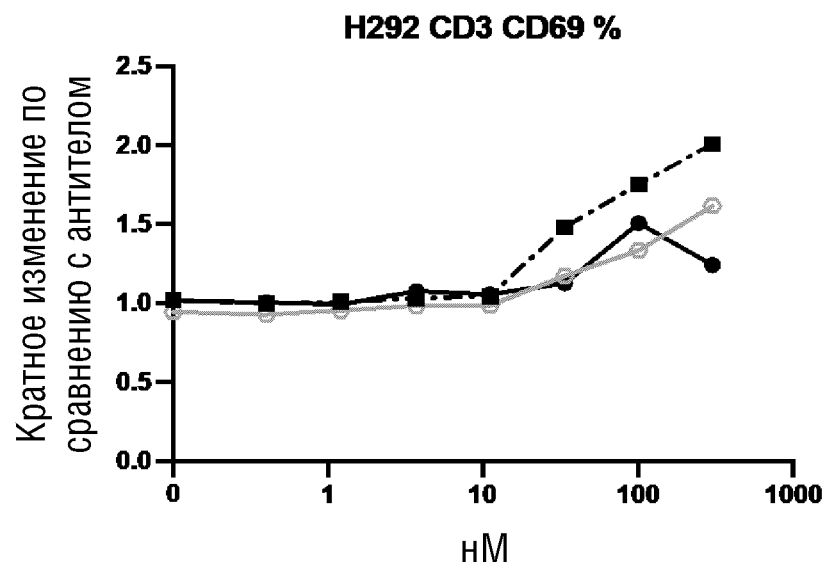


- TNT354a
- TNT358a
- TNT266a

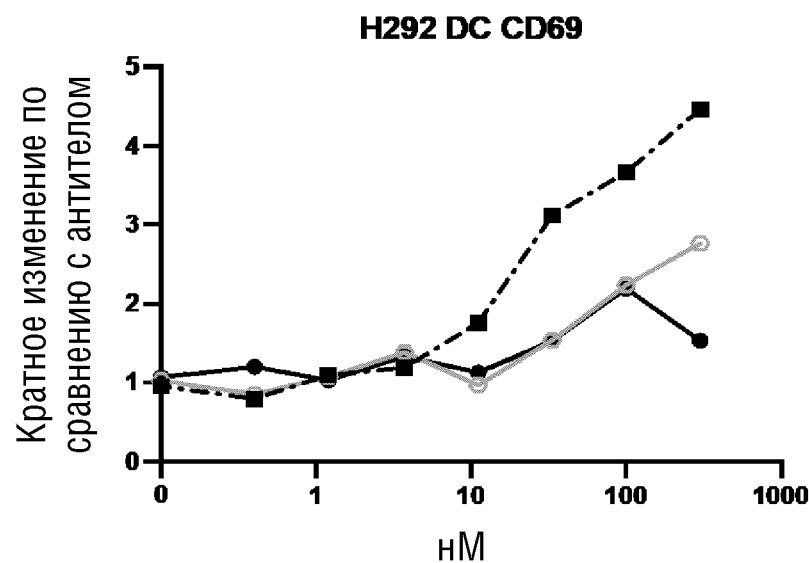
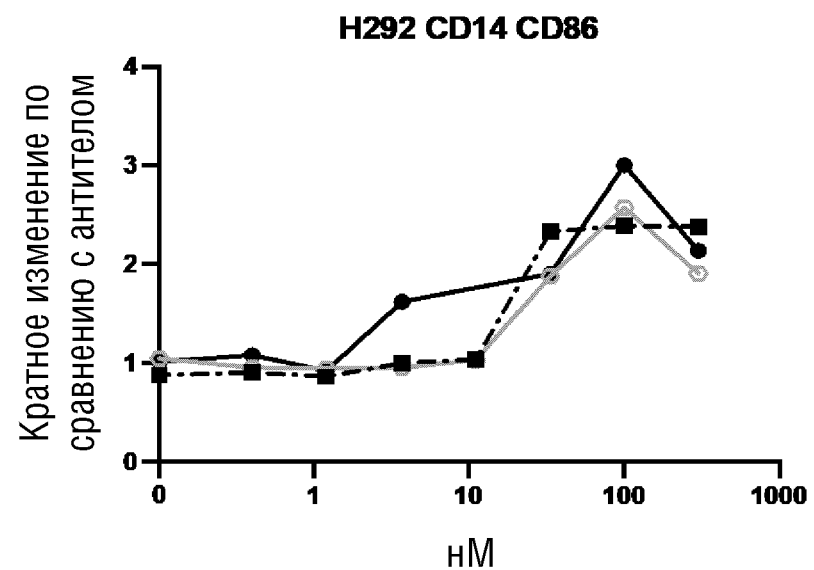




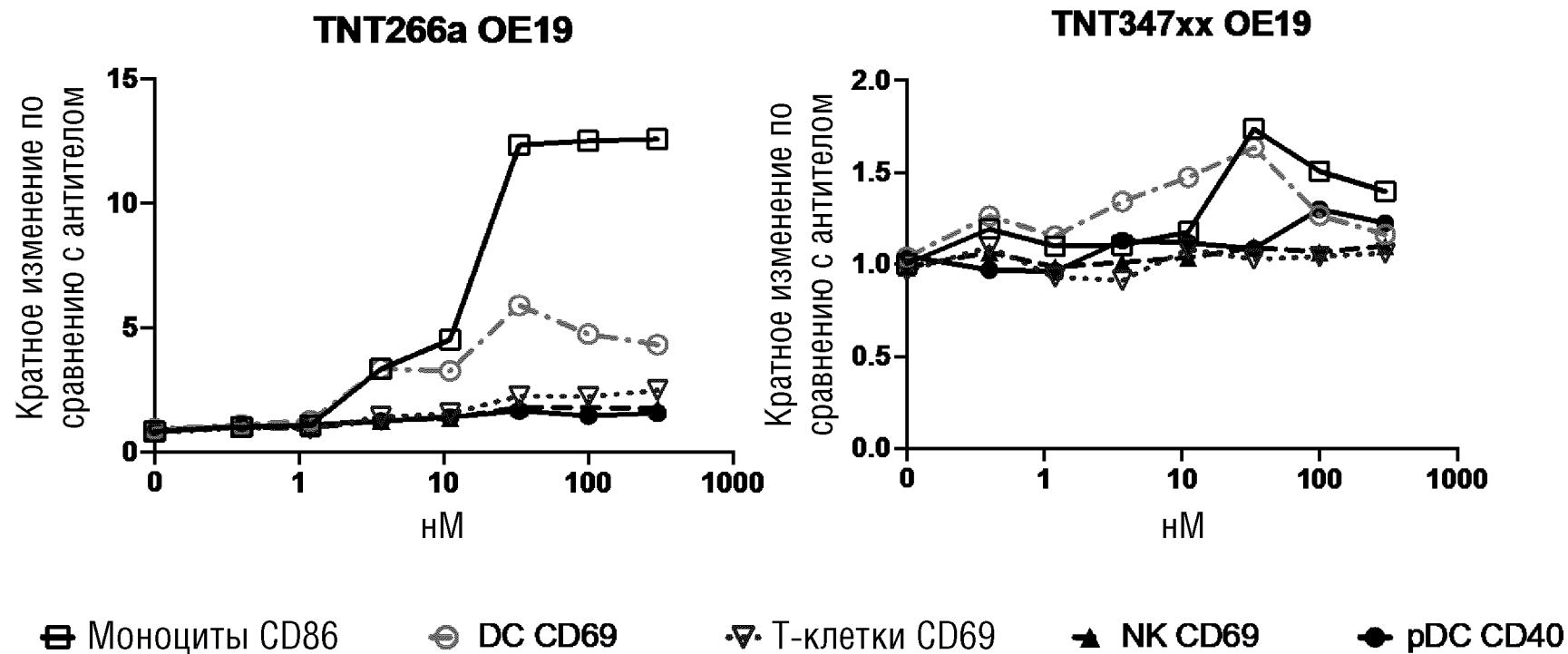
ФИГ.27



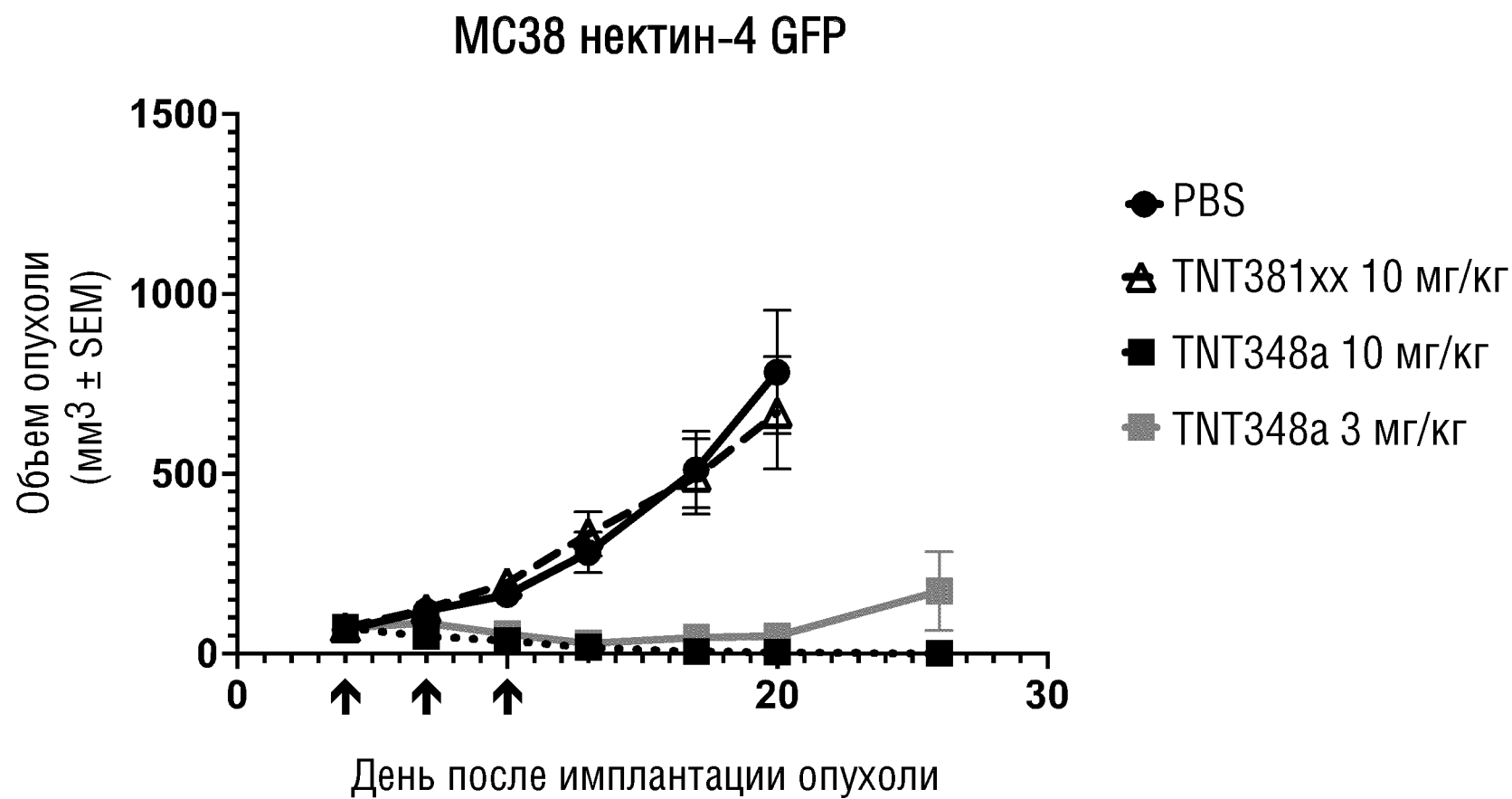
- TNT354a
- TNT358a
- TNT266a



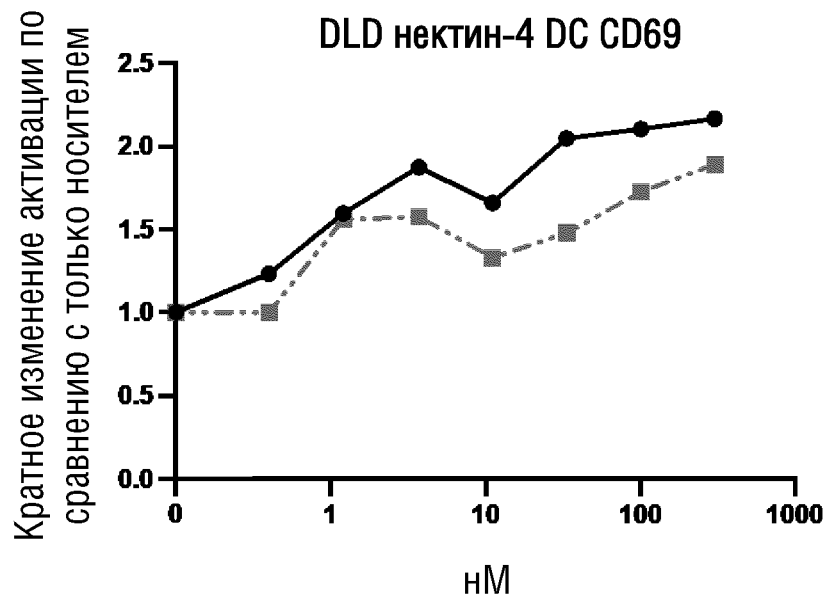
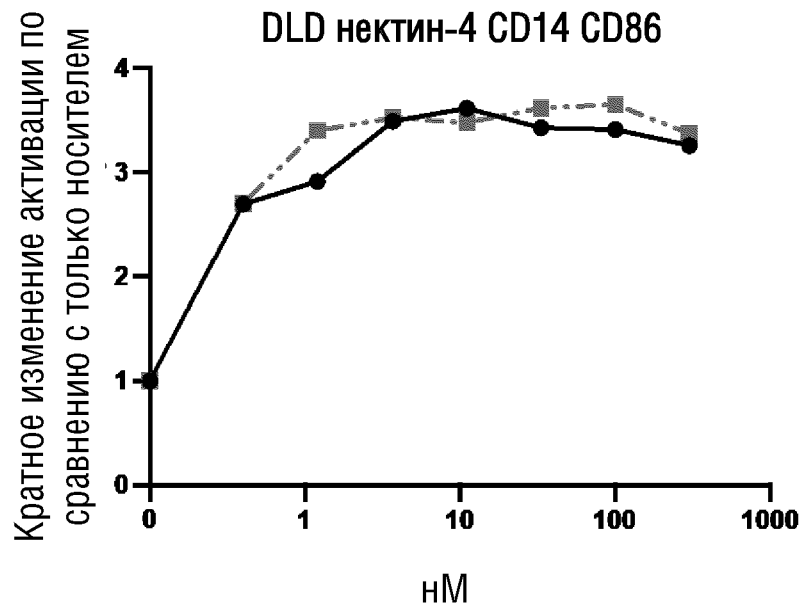
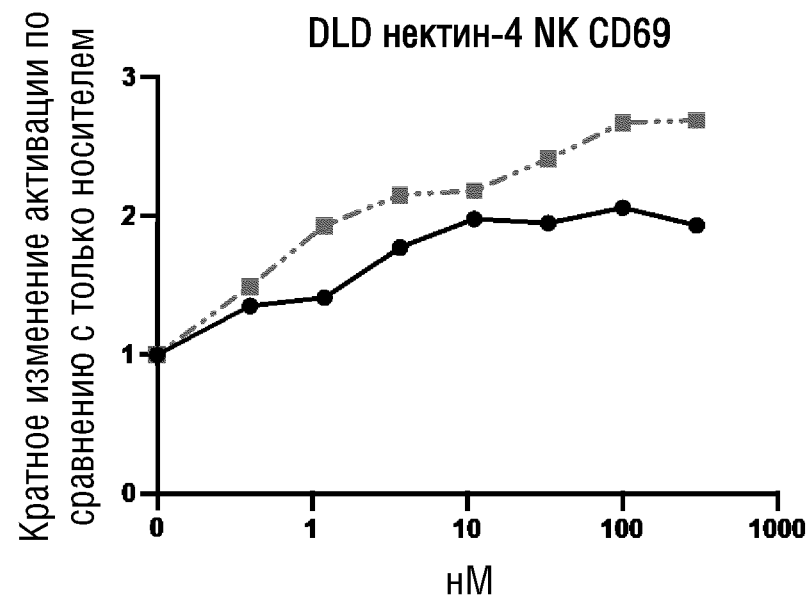
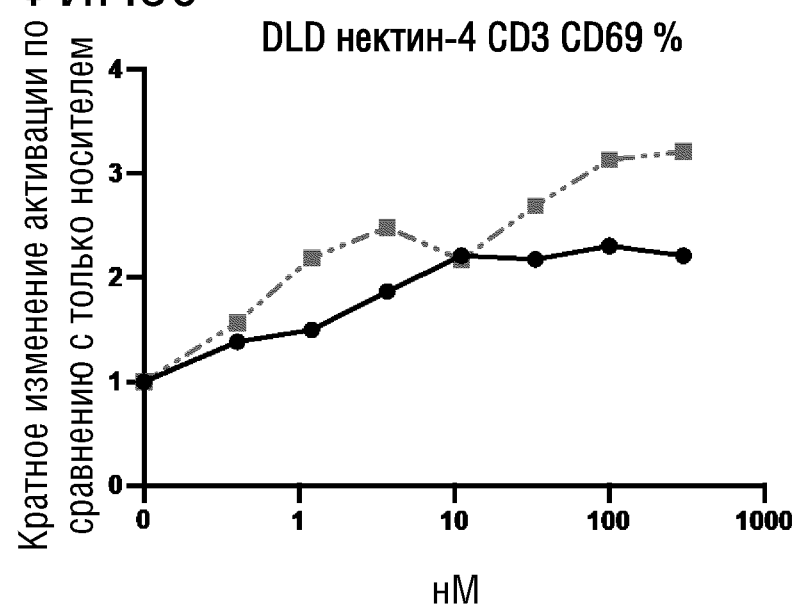
ФИГ.28



ФИГ.29

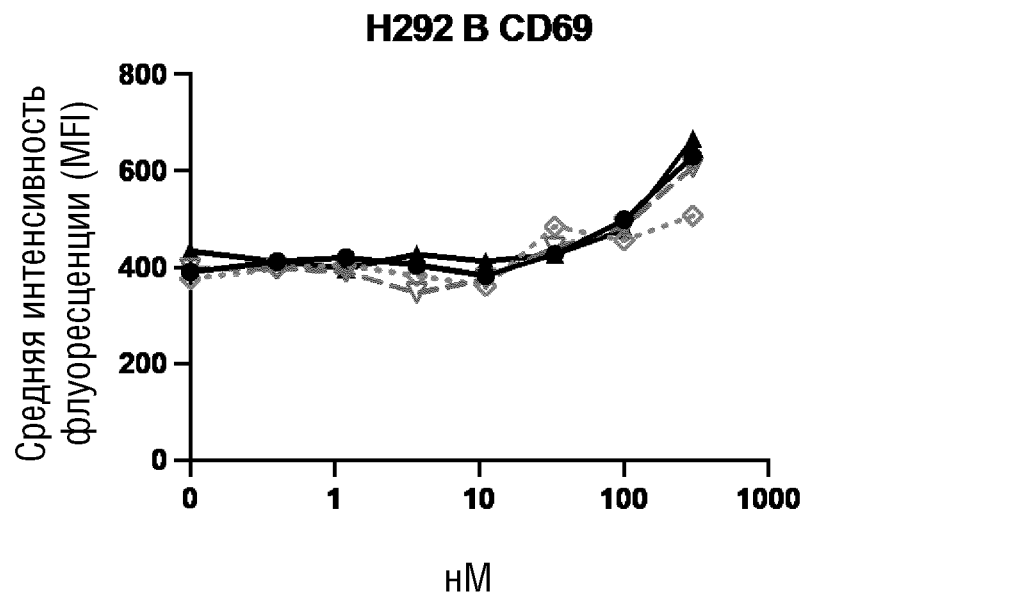
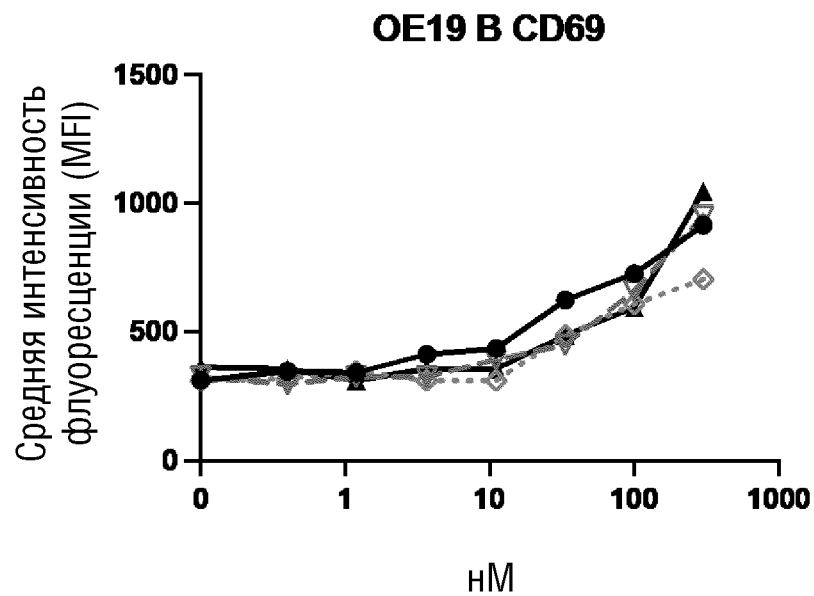
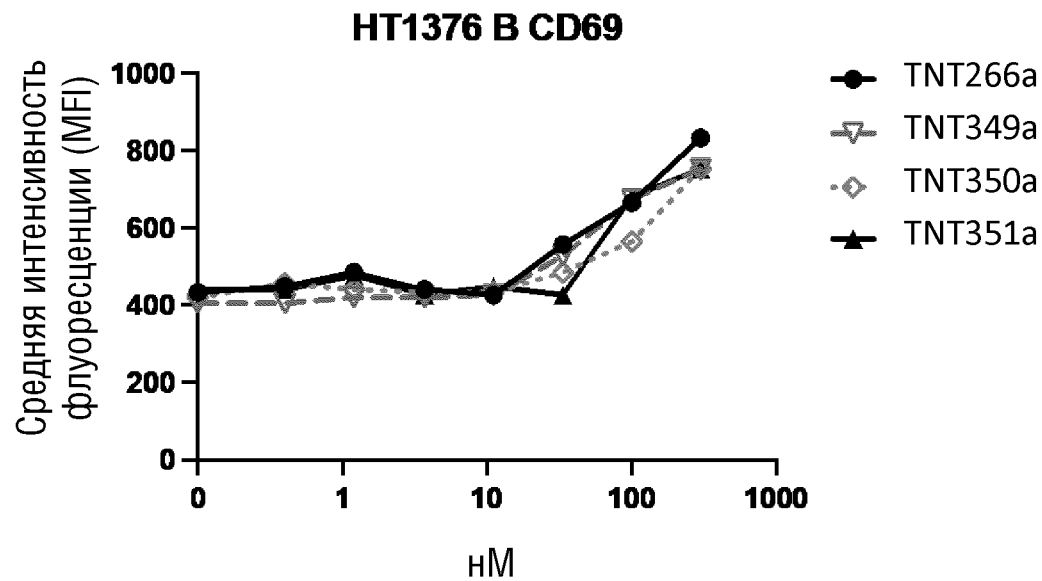
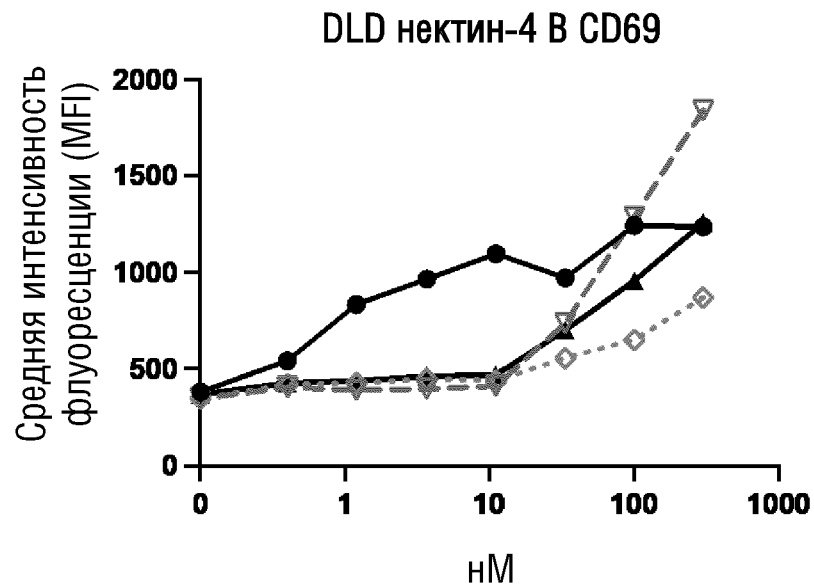


ФИГ.30

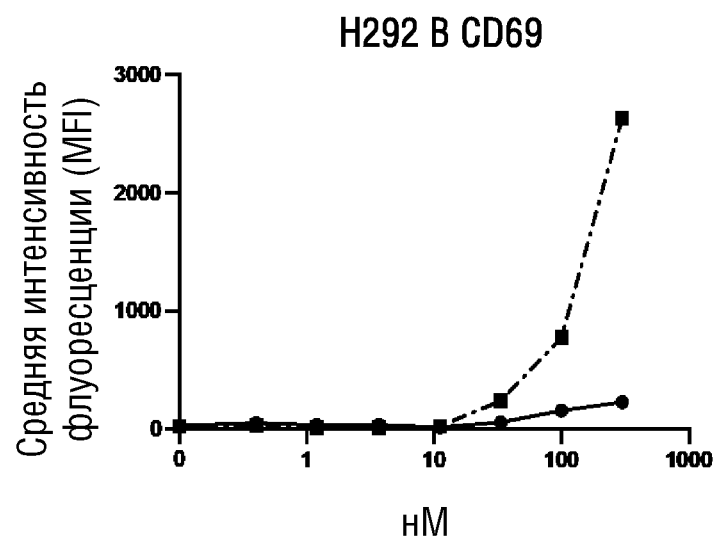
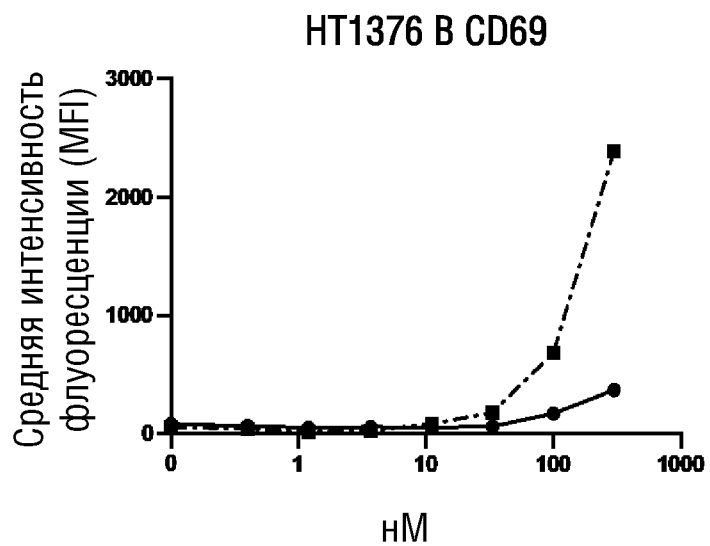
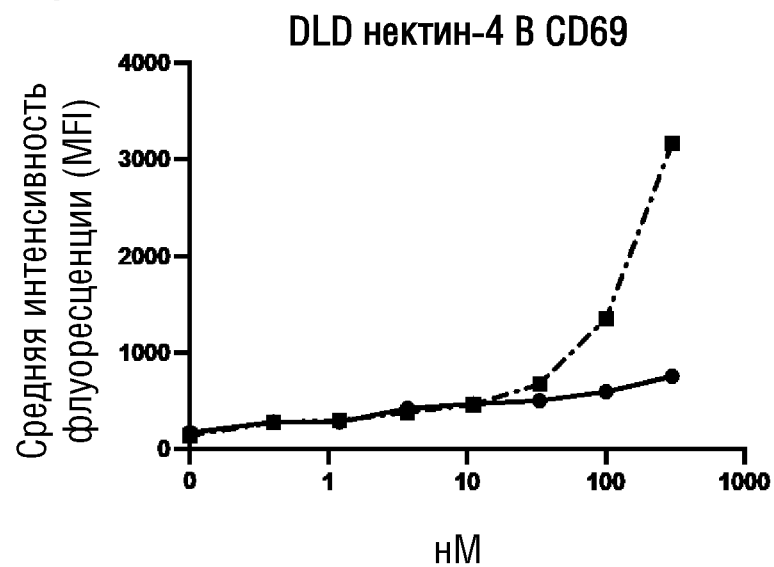


● TNT266a  
■ TNT363a

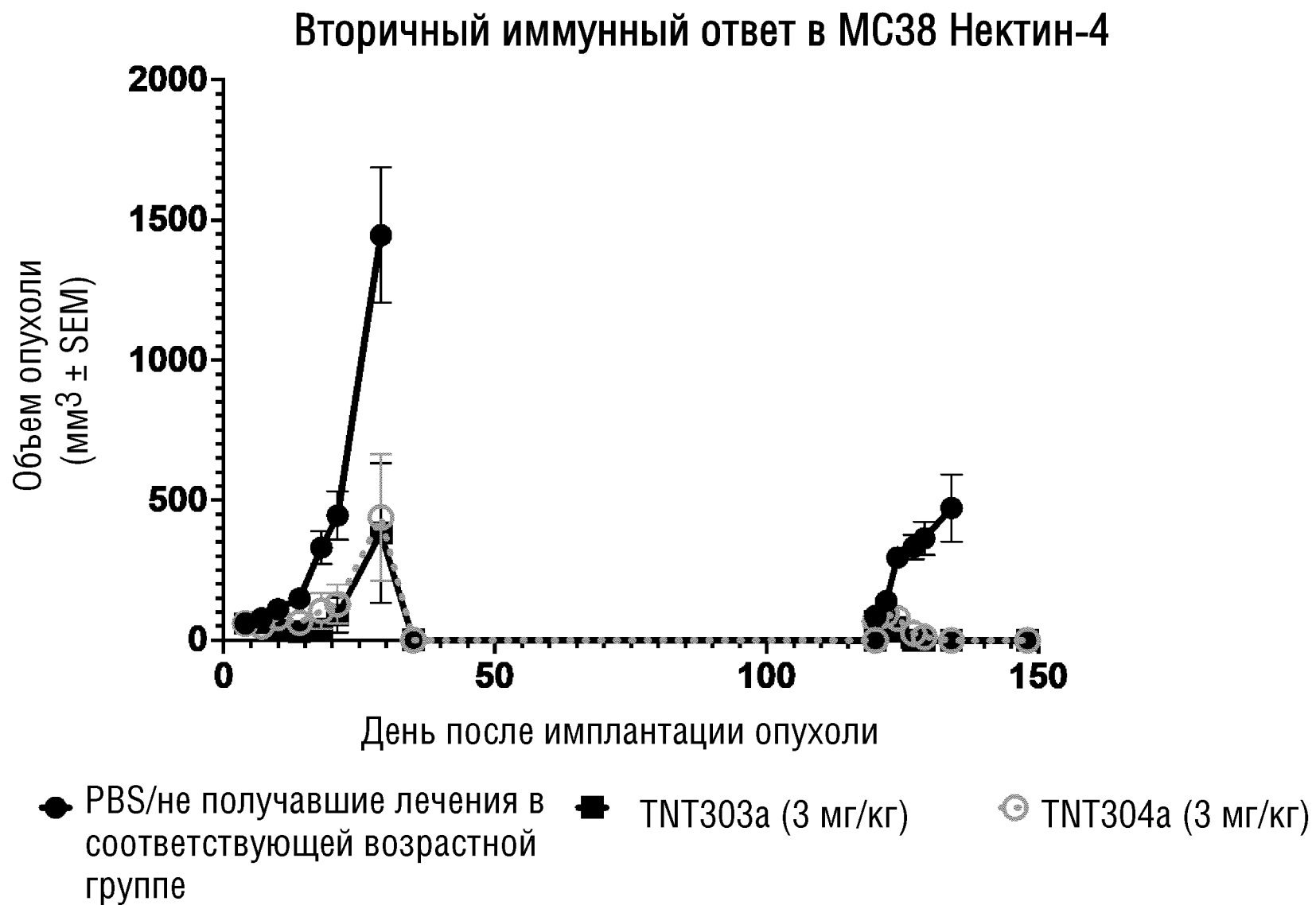
# ФИГ.31



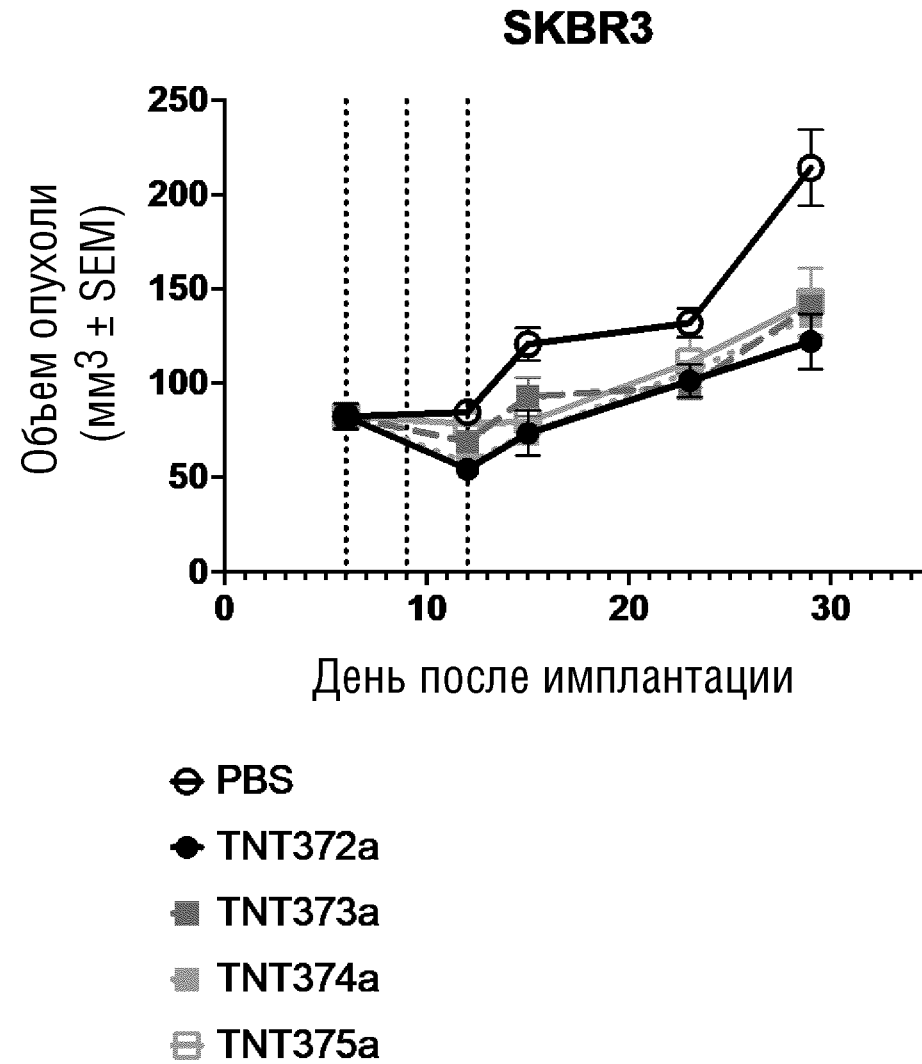
# ФИГ.32



ФИГ.33



ФИГ.34

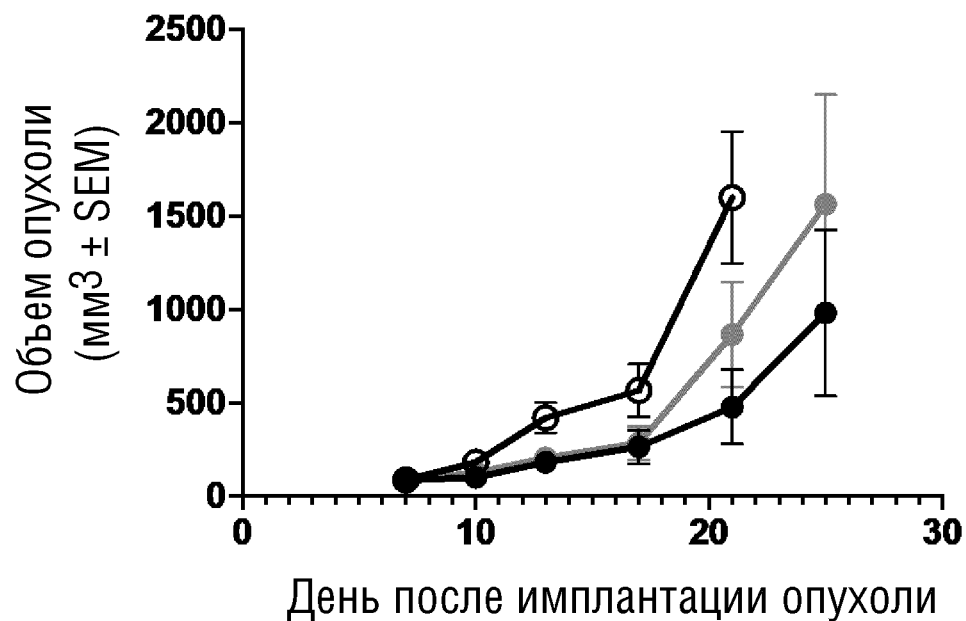




# ФИГ.35А

(50k рецепторов)

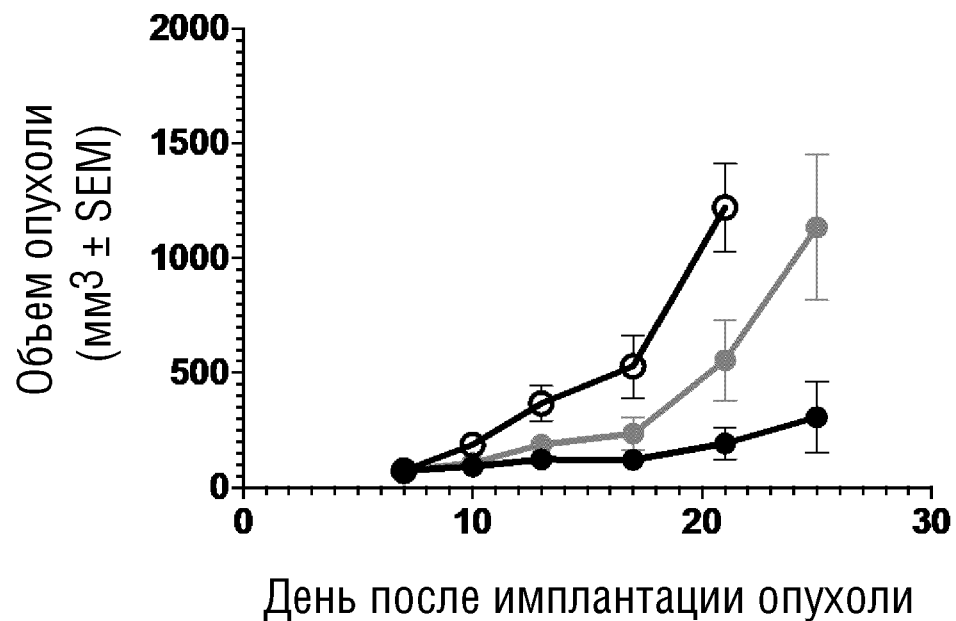
СТ26 со средней экспрессией нектин-4



- PBS
- TNT372a
- ◆ TNT348a

(5k рецепторов)

СТ26 с низкой экспрессией нектин-4

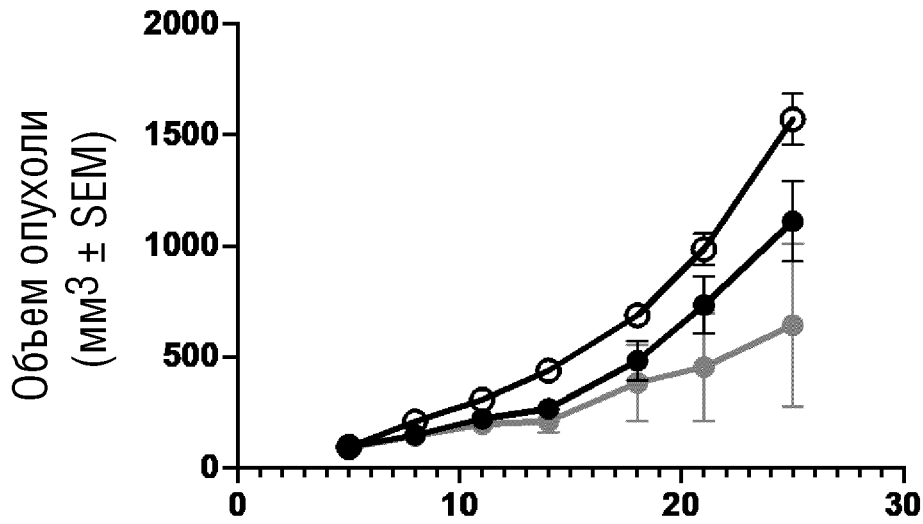


45/52

# ФИГ.35В

(30k рецепторов)

EMT6 со средней экспрессией нектин-4

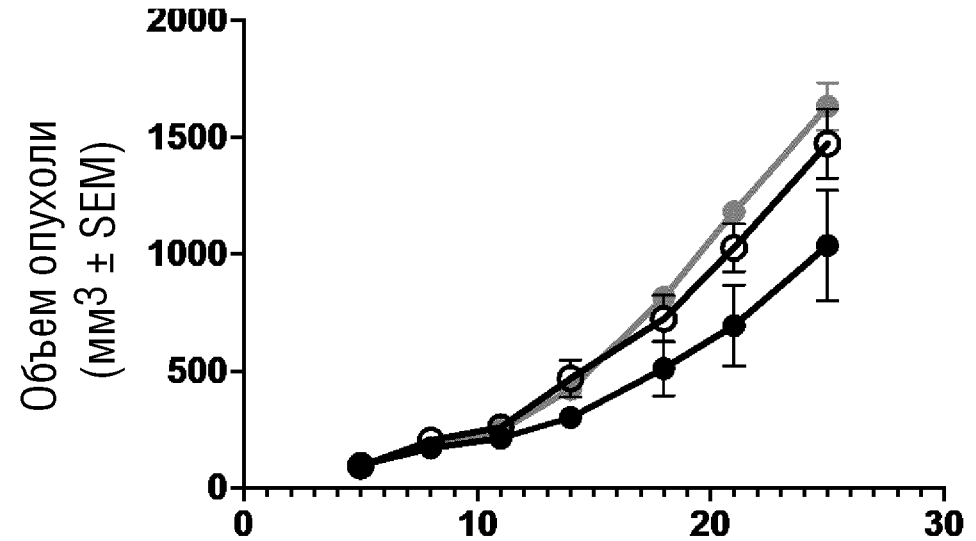


День после имплантации опухоли

- PBS
- TNT372a
- TNT348a

(10k рецепторов)

EMT6 с низкой экспрессией нектин-4

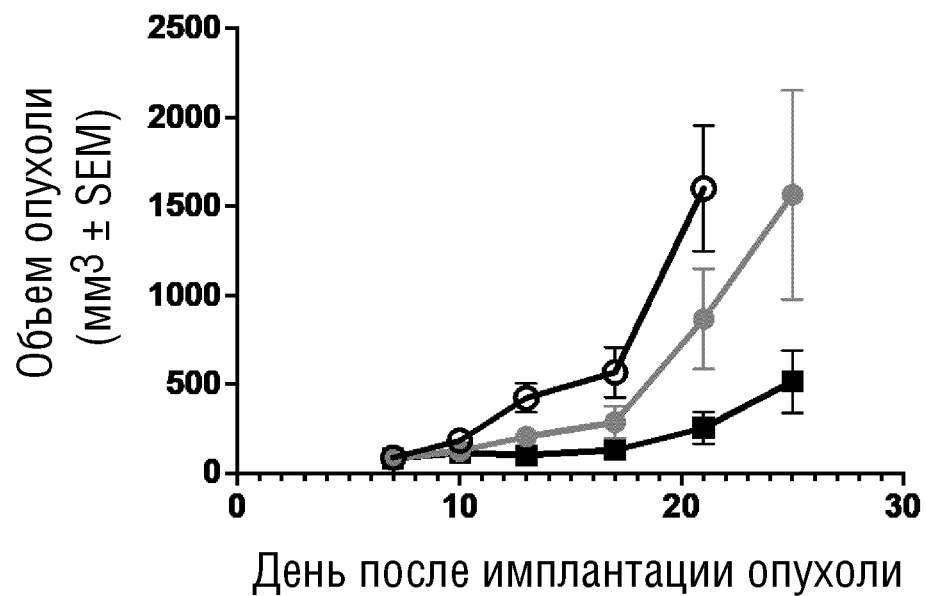


День после имплантации опухоли

# ФИГ.36А

(50k рецепторов)

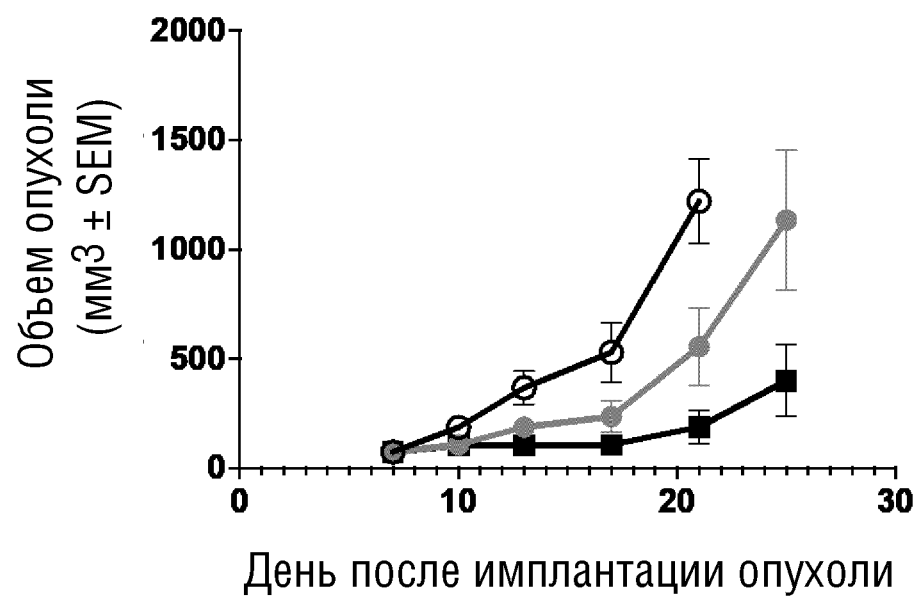
СТ26 со средней экспрессией нектин-4



- PBS
- TNT348a
- TNT303a

(5k рецепторов)

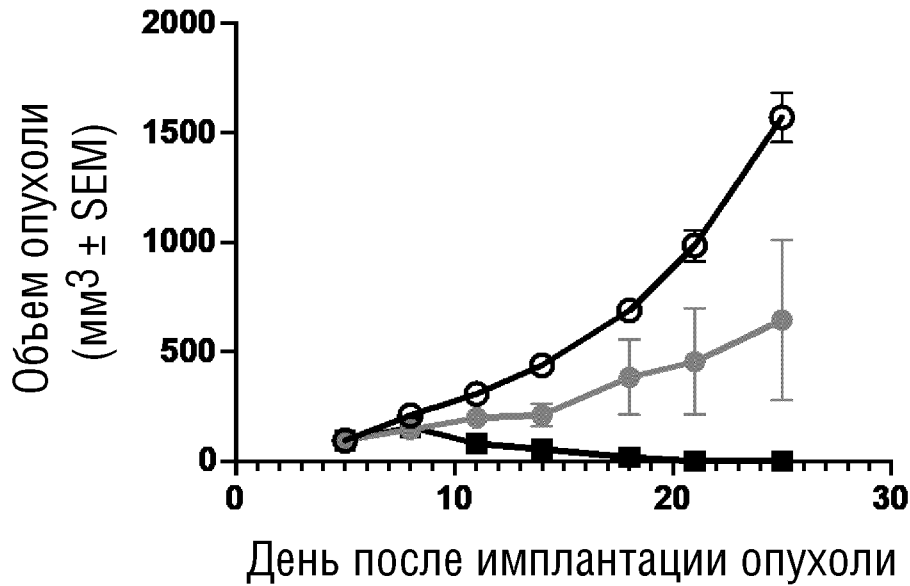
СТ26 с низкой экспрессией нектин-4



# ФИГ.36В

(30к рецепторов)

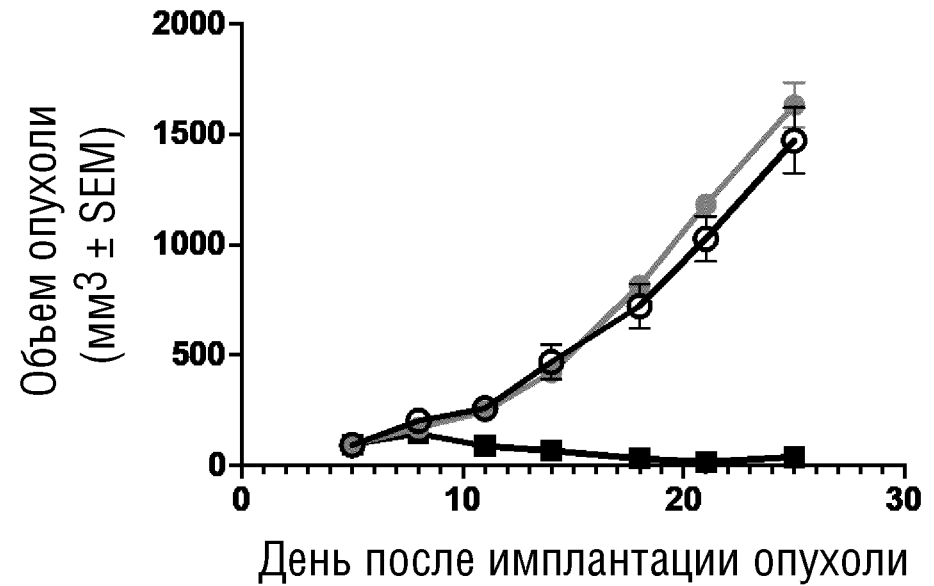
EMT6 со средней экспрессией нектин-4



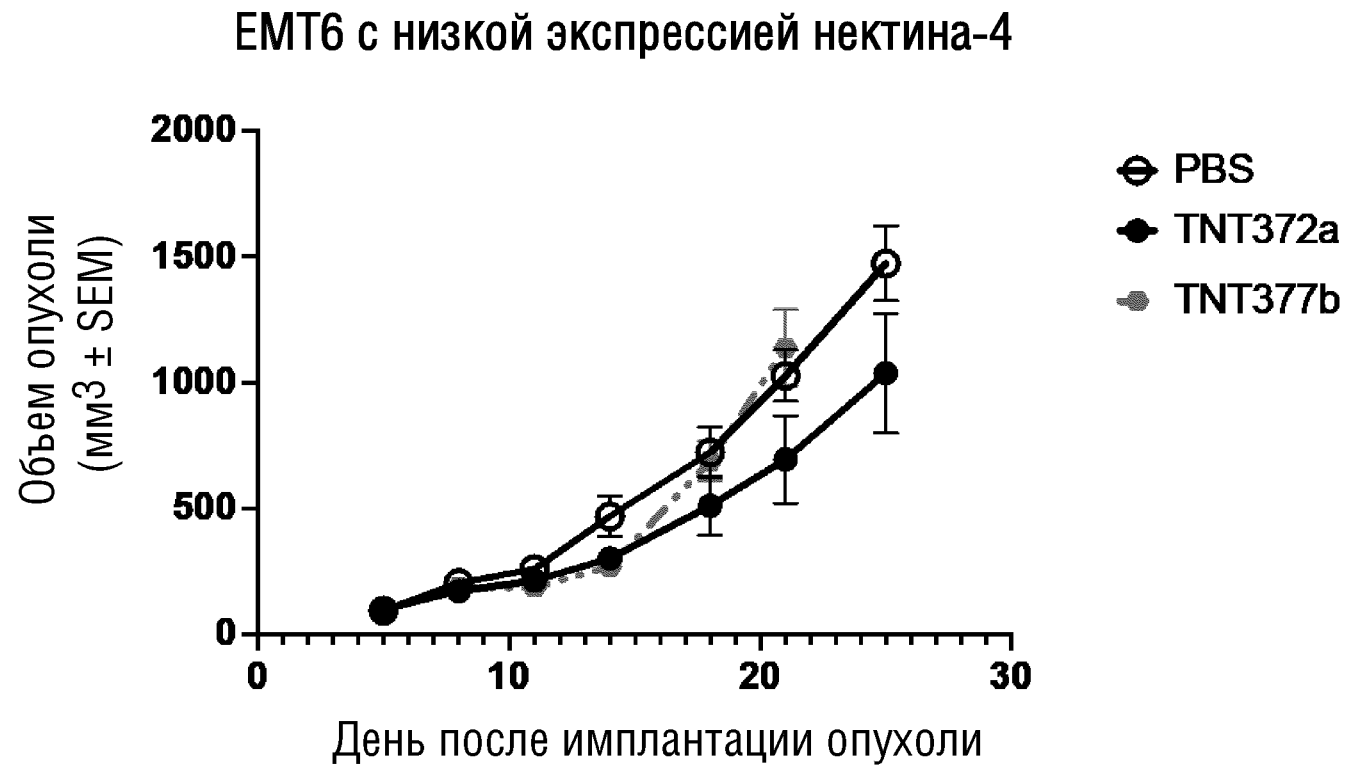
- PBS
- TNT348a
- TNT303a

(10к рецепторов)

EMT6 с низкой экспрессией нектин-4

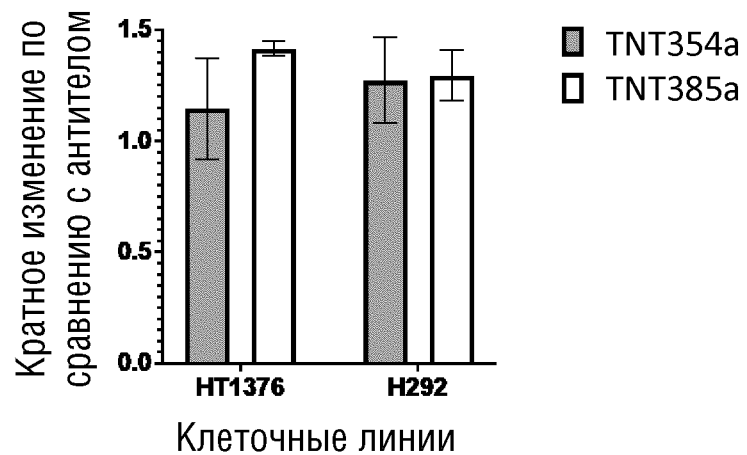


ФИГ.37

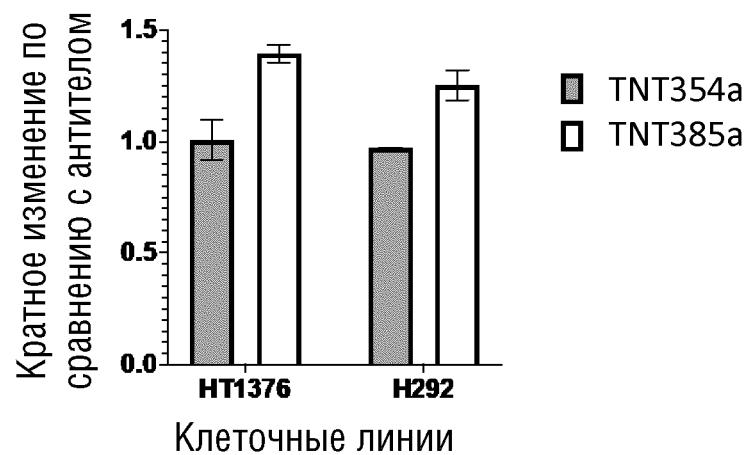


# ФИГ.38

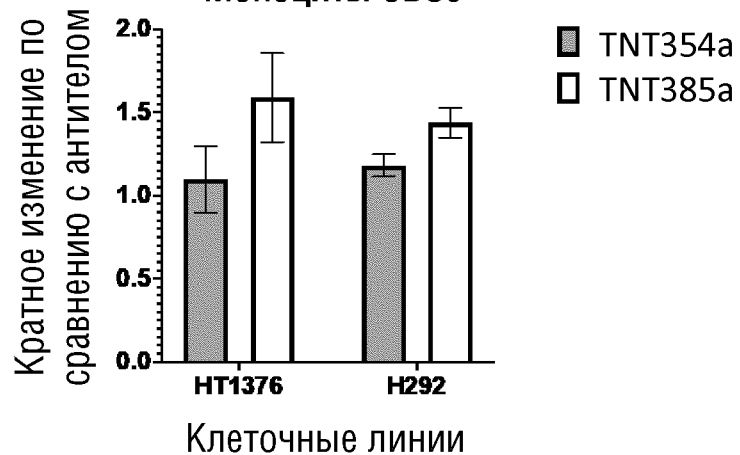
## Моноцитарный фагоцитоз



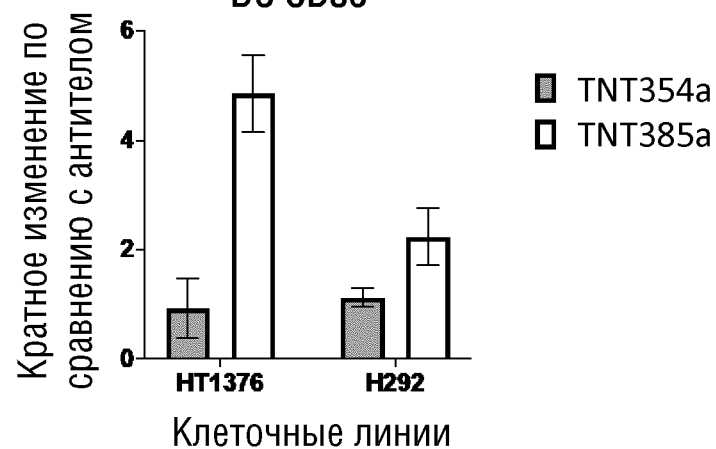
## В-клетки CD69



## Моноциты CD86

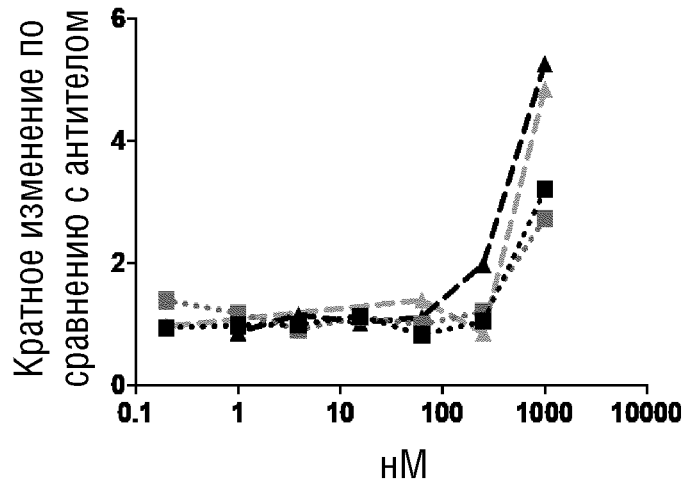


## DC CD86

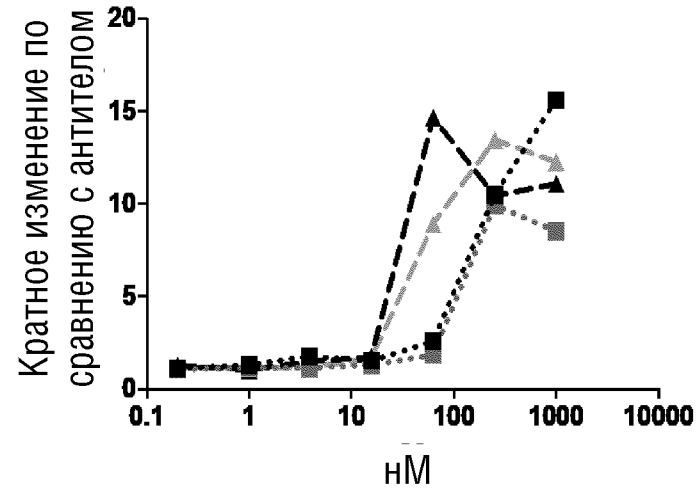


# ФИГ.39

## Количество НТ1376 DC



## Количество Н292 DC



ФИГ.40

