

抗 Nectin-4 抗体和抗 Nectin-4 抗体-药物偶联物及其医药用途

技术领域

5 本披露涉及抗 Nectin-4 抗体、抗 Nectin-4 抗体-依喜替康类似物偶联物，其制备方法，包含其的药物组合物，以及其用于制备治疗 Nectin-4 介导的疾病或病症的药物中的用途；尤其在用于制备抗癌药物中的用途。

背景技术

10 这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。
Nectin-4 (PVRL4) 是 66 kDa 的 I 型跨膜糖蛋白，属于 Ig 超家族的 Nectin 家族，其在上皮细胞、内皮细胞、免疫细胞和神经细胞的各种生物学过程(增殖、分化和迁移)中起关键作用。研究表明 Nectin-4 在膀胱癌、乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤组织的发生、浸润及转移过程中起重要作用。这一作用与 Cdc42 和 Rac 的
15 活化以及细胞骨架肌动蛋白的改变有关，进而引起肿瘤细胞的增殖、浸润和转移。
Nectin-4 是一种肿瘤特异表达的抗原，在膀胱癌，乳腺癌和肺癌中的表达比例分别达到 50%、49%和 86%，并且多见于预后不良的肿瘤，但是在大多数正常组织中却未检测到其表达。这些信息提示 Nectin-4 可以成为肿瘤治疗的理想靶点。

20 WO2012047724 中公开的 Enfortumab vedotin (Padcev)就是一款偶联 MMAE 的靶向 Nectin-4 的偶联物，可用于治疗先前接受过含铂化疗和 PD-1/L1 抑制剂治疗的成人局部晚期或转移性尿路上皮癌患者（European Commission Approves PADCEV (enfortumab vedotin) for Locally Advanced or Metastatic Urothelial Cancer. Press release, Seagen Inc; 04/13/2022. Accessed 04/14/2022）。更多的以
25 Nectin-4 为靶点的抗体-药物偶联物作为抗肿瘤药物研究具有重要意义。

发明内容

 本披露涉及抗 Nectin-4 抗体，抗 Nectin-4 抗体-依喜替康类似物偶联物以及其用途。
30 本披露提供了一种抗 Nectin-4 抗体，其中所述抗 Nectin-4 抗体以小于 0.1 nM 的 EC₅₀ 值与 T47D 细胞或 MDA-MB-468 细胞表达的 Nectin-4 蛋白结合，所述的 EC₅₀ 值是通过 FACS 方法测定的。
 在一些实施方案中，如上任一项所述的抗 Nectin-4 抗体包含 SEQ ID NO: 6 所示的重链可变区中所包含的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3；和 SEQ ID NO: 7
35 所示的轻链可变区中所包含的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3。
 在一些实施方案中，如上任一项所述的抗 Nectin-4 抗体包含重链可变区和轻

链可变区，其中：

a. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

5 如上所述的 HCDR1-3 和 LCDR1-3 按 Chothia 编号规则确定。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗 Nectin-4 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

b. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

10 如上所述的 HCDR1-3 和 LCDR1-3 按 IMGT 编号规则确定。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗 Nectin-4 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

c. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

15 如上所述的 HCDR1-3 和 LCDR1-3 按 Kabat 编号规则确定。

本披露提供了一种抗 Nectin-4 抗体, 其中所述抗 Nectin-4 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

20 a. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

如上所述的 HCDR1-3 和 LCDR1-3 按 Chothia 编号规则确定。

25 本披露提供了一种抗 Nectin-4 抗体, 其中所述抗 Nectin-4 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

b. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

如上所述的 HCDR1-3 和 LCDR1-3 按 IMGT 编号规则确定。

30 本披露提供了一种抗 Nectin-4 抗体, 其中所述抗 Nectin-4 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

c. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

35 如上所述的 HCDR1-3 和 LCDR1-3 按 Kabat 编号规则确定。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗 Nectin-4 抗体是人抗体或其抗原结

合片段。

在一些实施方案中，如上任一项所述的抗 Nectin-4 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区与 SEQ ID NO: 6 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、
5 95%、96%、97%、98%、99%或 100%的序列同一性，和/或所述轻链可变区与
SEQ ID NO: 7 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、
99%或 100%的序列同一性；

在一些实施方案中，如上任一项所述的抗 Nectin-4 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

10 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 6 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 7
所示；或

在一些实施方案中，如上任一项所述的抗 Nectin-4 抗体进一步包含抗体重链
恒定区和轻链恒定区；优选地，所述重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4
恒定区，所述轻链恒定区选自人抗体 κ 和 λ 链恒定区；更优选地，所述抗体包含
15 如 SEQ ID NO: 4 所示的重链恒定区和如 SEQ ID NO: 5 所示的轻链恒定区。

在一些实施方案中，如上任一项所述的抗 Nectin-4 抗体包含：

与 SEQ ID NO: 21 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、
97%、98%、99%或 100%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 22 具有至少
85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序
20 列同一性的轻链。

在一些实施方案中，如上任一项所述的抗 Nectin-4 抗体包含：

如 SEQ ID NO:21 所示的重链和如 SEQ ID NO: 22 所示的轻链。

在一些实施方案中，如上任一项所述的抗 Nectin-4 抗体，其中所述抗 Nectin-4
抗体以小于 0.1 nM 的 EC_{50} 值与 T47D 细胞或 MDA-MB-468 细胞表达的 Nectin-4
25 蛋白结合，所述的 EC_{50} 值是通过 FACS 方法测定的。

在一些实施方案中，本披露还提供一种抗 Nectin-4 抗体，其中所述抗体与如
前任一项所述的抗 Nectin-4 抗体竞争性结合人 Nectin-4。

在一些实施方案中，本披露还提供一种核酸分子，其编码如前任一项所述的
抗 Nectin-4 抗体。

30 在一些实施方案中，本披露还提供一种宿主细胞，其包含如前任一项所述的
核酸分子。

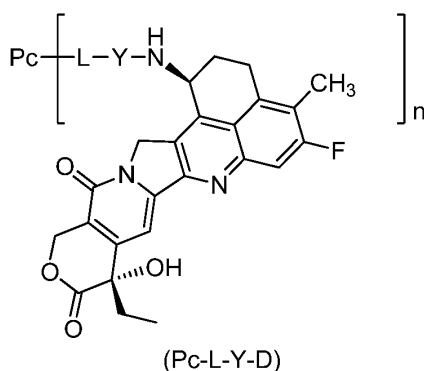
在一些实施方案中，本披露还提供一种药物组合物，其含有治疗有效量的如
前任一项所述的抗 Nectin-4 抗体，或如前所述的核酸分子，以及一种或更多种药
学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

35 在一些实施方案中，本披露还提供一种免疫偶联物，其包含如前任一项所述
的抗 Nectin-4 抗体和效应分子，其中，所述效应分子偶联至所述抗 Nectin-4 抗体；

优选地，所述效应分子选自放射性同位素、抗肿瘤剂、免疫调节剂、生物反应修饰剂、凝集素、细胞毒性药物、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶、金属离子，以及其任何组合。

5 在一些实施方案中，本披露还提供一种用于免疫检测或测定 Nectin-4 的方法，所述方法包括如前一项所述的抗 Nectin-4 抗体接触受试者或来自受试者的样品的步骤。

在一些实施方案中，本披露还提供一种通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐：



10 其中：

Y 选自 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 、 $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$ 、 $-O-CR^1R^2-$ 、 $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 和 $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ；

15 R^a 和 R^b 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟烷基、环烷基和杂环基；或者， R^a 和 R^b 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

R^1 选自卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基； R^2 选自氢原子、卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基；或者， R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

20 或者， R^a 和 R^2 与其相连的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

m 为 0 至 4 的整数；非限制性实施例如 m 选自 0、1、2、3 和 4；

n 为 1 至 10；

L 为接头单元；

Pc 为如前一项所述的抗 Nectin-4 抗体。

25 在一些实施方案中，如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中 n 为 1 至 8。在一些实施方案中， n 为 3 至 8。

在一些实施方案中，如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物

偶联物或其药学上可接受的盐，

其中：

Y 为 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ；

R^a 和 R^b 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素和 C_{1-6} 烷基；

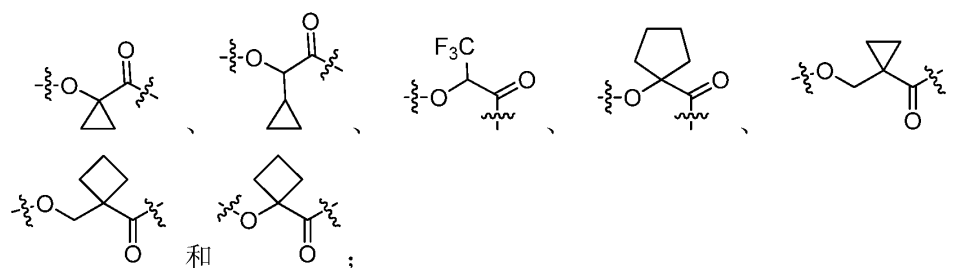
5 R^1 为卤代 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基；

R^2 选自氢原子、卤代 C_{1-6} 烷基和 C_{3-6} 环烷基；

或者， R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成 C_{3-6} 环烷基；

m 为 0 或 1。

10 在一些实施方案中，如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中 Y 选自：



其中 Y 的 O 端与接头单元 L 相连。

15 在一些实施方案中，如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中接头单元-L-为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ ，

L^1 选自 $-(\text{琥珀酰亚胺-3-基-N})-W-C(O)-$ 、 $-CH_2-C(O)-NR^3-W-C(O)-$ 和 $-C(O)-W-C(O)-$ ，其中 W 选自 C_{1-6} 亚烷基和 C_{1-6} 亚烷基- C_{3-6} 环烷基，其中所述的 C_{1-6} 亚烷基和 C_{1-6} 亚烷基- C_{3-6} 环烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、 C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{3-6} 环烷基中的一个或多个取代基所取代；

20 L^2 选自 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)p^1C(O)-$ 和化学键，其中 p^1 为 1 至 20 的整数；

25 L^3 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基，其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸 (F)、丙氨酸 (A)、甘氨酸 (G)、缬氨酸 (V)、赖氨酸 (K)、瓜氨酸、丝氨酸 (S)、谷氨酸 (E) 和天冬氨酸 (D) 中的氨基酸形成的氨基酸残基，并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代；

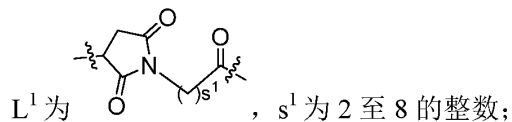
L^4 选自 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$ 、 $-C(O)NR^5-$ 、 $-C(O)NR^5(CH_2)_t-$ 和化学键，其中 t 为 1 至 6 的整数；

30 R^3 、 R^4 和 R^5 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、 C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 羟烷基；

R^6 和 R^7 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素、 C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6}

烷基、氘代 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 羟烷基。

在一些实施方案中，如前任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中接头单元-L-为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ ，



5 L^2 为化学键；

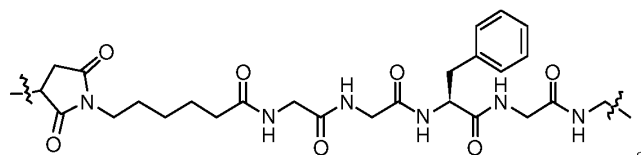
L^3 为四肽残基；

L^4 为 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$ ， R^5 、 R^6 或 R^7 相同或不同，且各自独立地为氢原子或 C_{1-6} 烷基， t 为 1 或 2；

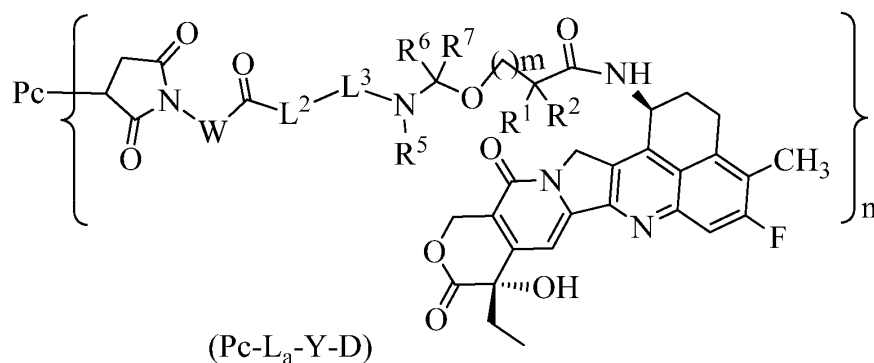
其中所述-L-的 L^1 端与 Pc 相连， L^4 端与 Y 相连。

10 在一些实施方案中，如前任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐， L^3 为 GGFG (SEQ ID NO: 23) 的四肽残基。

在一些实施方案中，如前任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中-L-为：



15 在一些实施方案中，如前任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其为通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐：



其中，

20 Pc 为如前所述的抗 Nectin-4 抗体；

m 为 0 至 4 的整数；

n 为 1 至 10；

R^1 选自卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基； R^2 选自氢原子、卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、

环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基；或者， R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

W 选自 C_{1-6} 亚烷基和 C_{1-6} 亚烷基- C_{3-6} 环烷基，其中所述的 C_{1-6} 亚烷基和 C_{3-6} 环烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、 C_{1-6} 烷基、氯代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{3-6} 环烷基的一个或多个取代基所取代；

L^2 选自 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)p^1C(O)-$ 和化学键，其中 p^1 为 1 至 20 的整数；

L^3 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基，其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸 (F)、丙氨酸 (A)、甘氨酸 (G)、缬氨酸 (V)、赖氨酸 (K)、瓜氨酸、丝氨酸 (S)、谷氨酸 (E) 和天冬氨酸 (D) 中的氨基酸形成的氨基酸残基，并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代；

R^5 选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基；

R^6 和 R^7 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基。

在一些实施方案中，如前任一所述通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其为通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐：其中，

Pc 为如前任一所述的抗 Nectin-4 抗体；

m 为 0 至 4 的整数；

n 为 1 至 10；

R^1 选自卤素、卤代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{3-6} 环烷基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、杂环基、芳基和杂芳基； R^2 选自氢原子、卤素、卤代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{3-6} 环烷基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、杂环基、芳基和杂芳基；或者， R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成 C_{3-6} 环烷基或杂环基；

W 选自 C_{1-6} 亚烷基和 C_{1-6} 亚烷基- C_{3-6} 环烷基，其中所述的 C_{1-6} 亚烷基和 C_{1-6} 亚烷基- C_{3-6} 环烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、 C_{1-6} 烷基、氯代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{3-6} 环烷基的一个或多个取代基所取代；

L^2 选自 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)p^1C(O)-$ 和化学键，其中 p^1 为 1 至 20 的整数；

L^3 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基，其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸 (F)、丙氨酸 (A)、甘氨酸 (G)、缬氨酸 (V)、赖氨酸 (K)、瓜氨酸、丝氨酸 (S)、谷氨酸 (E) 和天冬氨酸 (D) 中的氨基酸形成的氨基酸残基，并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、 C_{1-6} 烷基、氯代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6}

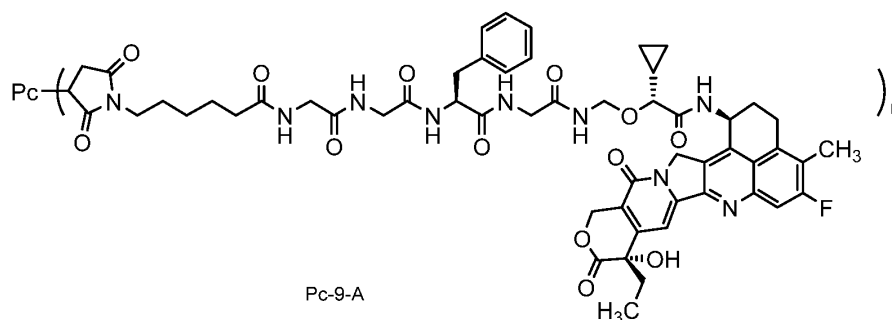
烷基、C₁₋₆ 烷氧基和 C₃₋₆ 环烷基中的一个或多个取代基所取代；

R⁵ 选自氢原子、C₁₋₆ 烷基、卤代 C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基和 C₁₋₆ 羟烷基；

R⁶ 和 R⁷ 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素、C₁₋₆ 烷基、卤代 C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基和 C₁₋₆ 羟烷基；

5 所述的杂环基包含 3 至 6 个环原子，其中 1-3 个是选自氮、氧和硫的杂原子。

在一些实施方案中，如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，所述抗体-药物偶联物为：



其中：

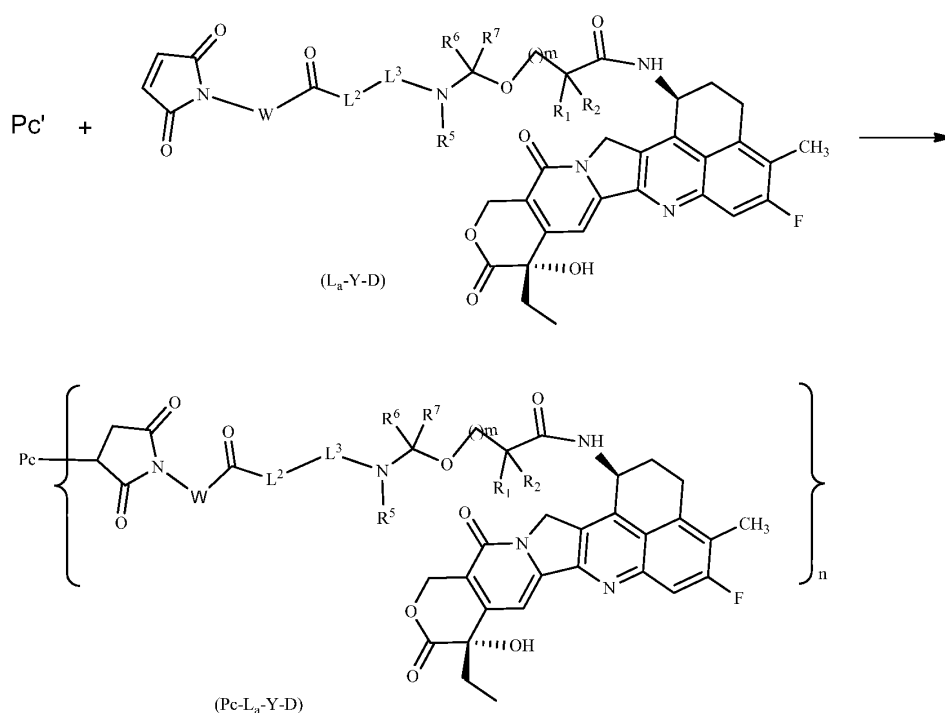
10 n 为 1 至 8；

Pc 为抗 Nectin-4 抗体，其包含如 SEQ ID NO: 21 所示的重链和如 SEQ ID NO: 22 所示的轻链。

在一些实施方案中，如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，n 为 1 至 8。

15 在一些实施方案中，如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，m 非限制性实施选自 0、1、2、3 和 4；

在一些实施方案中，本披露还提供一种制备如前一项所述通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的方法，其包括以下步骤：



Pc'与通式(L_a-Y-D)所示的化合物进行偶联反应,得到通式(Pc-L_a-Y-D)所示的化合物;

其中:

5 Pc'为Pc经还原后所得;

n、m、W、L²、L³、R¹、R²、R⁵、R⁶和R⁷如前一项中所定义。

在一些实施方案中,n为0-10,优选1-10,更优选1-8,或2-8,或2-7,或2-4,或3-8,或3-7,或3-6,或4-7,或4-6,或4-5的平均值;在一些实施方案中,n为1,2,3,4,5,6,7,8,9,10的平均值。

10 在一些实施方案中,本披露还提供一种药物组合物,其包含如前一项所述的抗Nectin-4抗体,或如前一项所述的核酸分子,或如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

15 在一些实施方案中,本披露还提供如前一项所述的抗Nectin-4抗体,或如前一项所述的核酸分子,或如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,或如前一项所述的药物组合物在制备用于治疗Nectin-4介导的疾病或病症的药物中的用途。

20 在一些实施方案中,本披露还提供如前一项所述的抗Nectin-4抗体,或如前一项所述的核酸分子,或如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,或如前一项所述的药物组合物在制备用于治疗和/或预防肿瘤和癌症的药物中的用途,其中所述肿瘤和癌症选自乳腺癌、胰腺癌、肺癌、食道癌、

非小细胞肺癌、喉部肿瘤、咽部肿瘤、口腔肿瘤、胃癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、头颈癌、鳞状细胞癌和黑色素瘤。

在一些实施方案中，本披露还提供一种试剂盒，其包含如前一项所述的抗 Nectin-4 抗体，或如前一项所述的核酸分子，或如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或如前一项所述的药物组合物。

在一些实施方案中，本披露还提供一种预防或治疗疾病或病症的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如前一项所述的抗 Nectin-4 抗体，或如前一项所述的核酸分子，或如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或如前一项所述的药物组合物。在一些实施方案中，所述疾病或病症优选为肿瘤、自身免疫性疾病或感染性疾病；在一些实施方案中，所述疾病或病症为与 Nectin-4 有关的疾病或病症。

另一方面，本披露提供了一种药物组合物，其包含如前一项所述的抗 Nectin-4 抗体、抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。在一些实施方案中，所述单位剂量的药物组合物中含有 0.1mg-3000mg 或 1mg-1000mg 如前所述的抗 Nectin-4 抗体或如前所述的抗体-药物偶联物。

另一方面，本披露提供了如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物作为药物的用途。

另一方面，本披露提供了如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物在制备用于治疗 Nectin-4 介导的疾病或病症的药物中的用途，在一些实施方案中，所述 Nectin-4 介导的疾病或病症为 Nectin-4 高表达癌症，中表达癌症或低表达癌症。

另一方面，本披露提供了如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物在制备用于治疗或预防肿瘤或癌症的药物中的用途，在一些实施方案中，所述肿瘤或癌症选自乳腺癌、胰腺癌、肺癌、食道癌、非小细胞肺癌、喉部肿瘤、咽部肿瘤、口腔肿瘤、胃癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、头颈癌、鳞状细胞癌和黑色素瘤。

另一方面，本披露进一步涉及一种用于治疗或预防肿瘤的方法，该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效剂量的如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物；在一些实施方案中，其中所述的肿瘤为与 Nectin-4 高表达相关的癌症，与 Nectin-4 中表达相关的癌症或与 Nectin-4 低表达相关的癌症。

另一方面，本披露进一步涉及一种用于治疗或预防肿瘤或癌症的方法，该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效剂量的如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物；在一些实施方案中，其中所述肿瘤或癌症选自乳腺癌、胰腺癌、肺癌、食道癌、非小细胞肺癌、喉部肿瘤、咽

部肿瘤、口腔肿瘤、胃癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、头颈癌、鳞状细胞癌和黑色素瘤。

另一方面，本披露进一步提供如前任一项所述的抗 Nectin-4 抗体或其抗体-药物偶联物作为药物，在一些实施方案中，作为治疗癌症或肿瘤的药物，更优选作为治疗 Nectin-4 介导的癌症的药物。

可将活性化合物制成适合于通过任何适当途径给药的形式，活性化合物可以以单位剂量的方式，或者是以受试者可以以单剂自我给药的方式。本披露化合物或组合物的单位剂量的表达方式可以是片剂、胶囊、扁囊剂、瓶装药水、药粉、颗粒剂、锭剂、栓剂、再生药粉或液体制剂。

本披露治疗方法中所用化合物或组合物的剂量通常将随疾病的严重性、受试者的体重和化合物的相对功效而改变。不过，作为一般性指导，合适的单位剂量可以是 0.1 mg ~ 1000mg。

本披露的药物组合物除活性化合物外，可含有一种或多种辅料，所述辅料选自以下成分：填充剂、稀释剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂或赋形剂等。根据给药方法的不同，组合物可含有 0.1 至 99 重量%的活性化合物。

本披露提供的 Nectin-4 抗体具有与细胞表面抗原良好的亲和力和良好的细胞内吞效率；本披露提供的 Nectin-4 抗体-药物偶联物有很强的肿瘤抑制效率，并且在动物体内具有更好的药效和更低的毒副作用。

附图说明

图 1 显示本披露的抗体与 Nectin4-CHOK1 细胞结合的结果。

图 2 显示本披露的抗体与 T47D 细胞结合的结果。

图 3 显示本披露的抗体与 MDA-MB-468 细胞结合的结果。

图 4：显示用 DT3C 测试的本披露的抗体的细胞内吞活性的结果。

图 5A 显示用 pHrodo 测试的本披露浓度为 20nM 的抗体在 Nectin4-CHOK1 细胞中的内吞活性结果。

图 5B 显示用 pHrodo 测试的本披露浓度为 5nM 的抗体在 Nectin4-CHOK1 细胞中的内吞活性的结果。

图 6 显示本披露 ADC 样品对 T47D 荷瘤小鼠移植瘤的疗效。

图 7 显示本披露 ADC 样品在 Nectin4 F344 RG 大鼠中的药代动力学测试结果。

发明详述

术语

除非另有限定，本文所用的所有技术和科学术语均与本披露所属领域普通技术人员的通常理解一致。虽然也可采用与本文所述相似或等同的任何方法和材料

实施或测试本披露,但本文描述了优选的方法和材料。描述和要求保护本披露时,依据以下定义使用下列术语。

当本披露中使用商品名时,旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的药物和活性药物部分。

5 除非有相反陈述,在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

本披露所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558(1968)中所述。

术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式发挥作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及后来修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构(即与氢、羧基、氨基和 R 基团结合的 α 碳)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物具有修饰的 R 基团(例如,正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构,但是以与天然存在的氨基酸类似的方式发挥作用的化学化合物。

本文中的术语“抗体”以最广义使用,并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体,多克隆抗体,多特异性抗体(例如双特异性抗体),全长抗体和抗体片段(或抗原结合片段,或抗原结合部分),只要它们展现出期望的抗原结合活性。

“天然抗体”指天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然 IgG 抗体是约 150,000 道尔顿的异四聚糖蛋白,由二硫键结合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从 N 至 C 端,每条重链具有一个可变区(VH),又称作可变重域,或重链可变域,接着是三个恒定域(CH1、CH2 和 CH3)。类似地,从 N 至 C 端,每条轻链具有一个可变区(VL),又称作可变轻域,或轻链可变域,接着是一个恒定轻域(也称轻链恒定区,CL)。

术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文可互换使用,指包含与天然抗体结构基本类似的结构,或重链含有如本文中定义的 Fc 区的抗体。

“分离的”抗体是已经与其天然环境的组分分开的抗体。本披露中,在一些实施方案中,抗体可纯化至大于 90%或 99%的纯度。在一些实施方案中,抗体通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或层析(例如,离子交换或反相 HPLC)方法进行纯化和测定。

术语“可变区”或“可变域”或“可变结构域”指抗体重链和/或轻链中涉及抗体结合抗原的域。天然 IgG 抗体 VH 和 VL 各包含四个保守的框架区(FR)和三个互补决定区(CDR)。其中,术语“互补决定区”或“CDR”指可变结构域内主要促成与抗原结合的区域;“框架”或“FR”是指可变结构域中除 CDR

残基之外的可变结构域残基。VH 包含 3 个 CDR 区：HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；VL 包含 3 个 CDR 区：LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。每个 VH 和 VL 由从氨基末端排到羧基末端按以下顺序排列的三个 CDR 和四个 FR 构成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。单个 VH 或 VL 可能足以赋予抗原结合特异性。

- 5 可以通过各种公知方案来确定 CDR 的氨基酸序列的边界，例如：“Kabat”编号规则（参见 Kabat 等（1991），“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD）、“Chothia”编号规则、“ABM”编号规则、“contact”编号规则（参见 Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001）和 ImMunoGenTics (IMGT) 编号规则（Lefranc, M.P.等，Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77（2003）；Front Immunol. 2018 Oct 16;9:2278）等；各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的，示例性的，如下表 1 中所示。

表 1. CDR 编号系统之间的关系

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

- 15 术语“轻链”包括可变区结构域 VL 及恒定区结构域 CL。VL 处于轻链的氨基末端。轻链包括 κ 链及 λ 链。

- 术语“重链”包括可变区结构域 VH 及三个恒定区结构域 CH1、CH2 及 CH3。VH 处于重链的氨基末端，且 CH 结构域处于羧基末端，其中 CH3 最接近多肽的羧基末端。重链可属于任何同种型，包括 IgG(包括 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4 亚型)、IgA(包括 IgA1 及 IgA2 亚型)、IgM 及 IgE。

- 20 术语“抗体片段”指不同于完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述部分与完整抗体所结合的抗原相结合。抗体片段的包括但不限于 Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)₂、单域抗体、单链 Fab (scFab)、双抗体、线性抗体、单链抗体分子（例如 scFv）；以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

- 25 术语“Fc 区”或“片段可结晶区”用于定义抗体重链的 C 末端区域，包括天然序列 Fc 区和经改造的 Fc 区。在一些实施方式中，人 IgG 重链的 Fc 区定义为从 Cys226 位置处的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。抗体重链的 Fc 区的边界还可以变化，例如缺失 Fc 区的 C 末端赖氨酸（根据 EU 编号系统的残基 447）或缺失 Fc 区的 C 末端甘氨酸和赖氨酸（根据 EU 编号系统的残基 446

和 447)。因此, 在一些实施方式中, 完整抗体的组合物可以包括去除了所有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方式中, 完整抗体的组合物可以包括没有去除 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方式中, 完整抗体的组合物具有带有和不带有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体混合物的抗体群体。用于本文所述抗体的合适天然序列 Fc 区包括人 IgG1、IgG2 (IgG2A、IgG2B)、IgG3 和 IgG4。除非本文中另有规定, Fc 区或恒定区中的氨基酸残基的编号方式依照 EU 编号系统, 又称作 EU 索引, 如记载于 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991。

术语“嵌合”抗体指抗体中的重链和/或轻的一部分自特定的来源或物种衍生, 而重链和/或轻链的剩余部分自不同来源或物种衍生的抗体。

术语“人源化”抗体是保留非人抗体的反应性同时在人中具有较低免疫原性的抗体。例如, 可以通过保留非人 CDR 区并用其对应物(即, 恒定区以及可变区的框架区部分)替换抗体的其余部分来实现。

术语“人抗体”意指可变区及恒定区是人序列的抗体。该术语涵盖源自人基因但具有, 例如, 降低可能的免疫原性、增加亲和力、消除可能会引起不期望的折叠的半胱氨酸或糖基化位点等序列已发生改变的抗体。该术语涵盖这些在非人细胞(其可能会赋予不具人细胞特征的糖基化)中重组产生的抗体。该术语亦涵盖已在含有一些或所有人免疫球蛋白重链及轻链基因座的转基因小鼠中饲养的抗体。人抗体的含义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

术语“亲和力成熟的”抗体指在抗体的一个或多个 CDR 中具有一处或多处改变、导致该抗体对抗原的亲和力与亲本抗体相比有所改进的抗体。在一些实施方式中, 亲和力成熟的抗体将具有纳摩尔或甚至皮摩尔量级的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知方法生成。Marks 等, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) 记载了通过 VH 和 VL 结构域改组进行的亲和力成熟。以下文献记载了 CDR 和/或框架残基的随机诱变: Barbas 等, *PNAS*, 91:3809-3813 (1994); Schier 等, *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton 等, *J.Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson 等, *J.Immunol.* 154 (7) :3310-9(1995) 及 Hawkins 等, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。

术语“单克隆抗体”指基本上均质的抗体的群, 即在该群中包含的抗体分子的氨基酸序列是相同的, 除了可能少量存在的天然突变以外。相比之下, 多克隆抗体制剂通常包含在其可变结构域具有不同氨基酸序列的多种不同抗体, 其通常特异性针对不同表位。“单克隆”表示从基本上均质的抗体群体获得的抗体的特征, 并且不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。例如, 单克隆抗体可以由 Kohler 等, (1975) *Nature* 256:495 描述的杂交瘤方法制备, 或者由重组 DNA 方法制备(参见例如美国专利号 4, 816, 567)。或者使用 Clackson 等, (1991) *Nature*

352:624-628 和 Marks 等, (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597 中描述的技术, 从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。亦可参见 Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731, 或利用含有所有或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法制备“单克隆抗体”。

- 5 术语“抗原”是指能够由抗体选择性结合, 且另外能够用于动物中以产生能够结合该抗原的抗体的分子或分子部分。抗原可具有一个或多个能够与不同的抗体相互作用的表位。

术语“表位”指能够与抗体特异性结合的抗原上的区域 (area 或 region)。表位可以由连续氨基酸串 (线性表位) 形成或包含非连续氨基酸 (构象表位), 例如因抗原的折叠 (即通过蛋白质性质的抗原的三级折叠) 而变成空间接近。构象表位和线性表位的差别在于: 在变性溶剂的存在下, 抗体对构象表位的结合丧失。表位包含处于独特空间构象的至少 3, 至少 4, 至少 5, 至少 6, 至少 7, 或 8-10 个氨基酸。

- 15 筛选结合特定表位的抗体 (即那些结合相同表位的抗体) 可以使用本领域公知方法来进行, 包括但不限于: 丙氨酸扫描、肽印迹 (见 *Meth. Mol. Biol.* 248 (2004) 443-463)、肽切割分析、表位切除、表位提取、抗原的化学修饰 (见 *Prot. Sci.* 9 (2000) 487-496) 和交叉阻断 (见 “Antibodies”, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY))。

- 20 与参照抗体“结合相同表位的抗体”或与参照抗体“竞争结合的抗体”指在竞争测定法中, 将参照抗体对抗原的结合阻断 50% 或更多的抗体, 或其对抗原的结合被参照抗体阻断 50% 或更多的抗体。还例如, 为了测定待测抗体是否与参照抗体结合相同表位, 在饱和条件下容许参照抗体结合抗原。在去除过量的参照抗体后, 评估待测抗体结合抗原的能力。为了确认待测抗体是否结合相同表位或仅仅受到空间原因阻碍结合, 可以使用常规实验 (例如, 肽突变和使用 ELISA、
- 25 RIA、表面等离子共振、流式细胞术或本领域可获得的任何其它定量或定性抗体结合测定的结合分析)。这种测定法应当以两种设置中进行, 即两种抗体均作为饱和抗体。如果在两种设置中, 均只有第一 (饱和) 抗体能够结合抗原, 那么可以得出结论, 该待测抗体和参照抗体竞争结合该抗原。

- 30 在一些实施方案中, 如在竞争性结合测定中所测量的 (参见例如, Junghans 等, *Cancer Res.* 50 (1990) 1495-1502), 如果一个抗体的 1 倍、5 倍、10 倍、20 倍或 100 倍过量抑制另一个抗体的结合至少 50%、至少 75%、至少 90% 或甚至 99% 或更多, 则认为两个抗体结合相同或重叠的表位。

- 35 在一些实施方案中, 对于抗原中那些能减少或消除一种抗体结合的氨基酸突变, 如果其基本上全部能减少或消除另一种抗体的结合, 则认为两种抗体结合“相同表位”; 如果其仅有一部分能减少或消除另一种抗体的结合, 则认为两种抗体具有“重叠表位”。

术语“亲和力”是指分子（例如，抗体）的单个结合部位与其结合配体（例如，抗原）之间非共价相互作用的总体的强度。除非另外指明，如本文所用，结合“亲和力”是指内部结合亲和力，其反映出结合对（例如，抗体与抗原）的成员之间 1:1 相互作用。分子 X 对其配体 Y 的亲和力通常可以由平衡解离常数(KD)表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法（包括本文所述的那些方法）测量。

如本文所使用的，术语“kassoc”或“ka”指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率，术语“kdis”或“kd”指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。术语“KD”指平衡解离常数，其获得自 kd 与 ka 的比率（即 kd/ka）并且表示为摩尔浓度（M）。可以使用本领域公知的方法测定抗体的 KD 值。例如，使用生物传感系统例如系统测量表面等离子体共振，或通过溶液平衡滴定法（SET）测量溶液中的亲和力。

术语“特异性地结合”、“特异性结合”或“结合”是指抗体以比针对其他抗原或表位更高的亲和力结合至某个抗原或该抗原内的表位。通常，抗体以约 1×10^{-7} M 或更小（例如约 1×10^{-8} M 或更小、约 1×10^{-9} M 或更小）的平衡解离常数（KD）结合抗原或抗原内的表位。在一些实施方式中，抗体与抗原结合的 KD 为该抗体结合至非特异性抗原（例如 BSA、酪蛋白）的 KD 的 10%，或更少（例如 1%）。可使用本领域已知的方法来测量 KD，例如通过 BIACORE[®] 表面等离子体共振测定法测量。然而，特异性结合至抗原或抗原内的表位的抗体可能对其它相关的抗原具有交叉反应性，例如，对来自其它物种（同源）（诸如人或猴，例如食蟹猕猴（*Macaca fascicularis*）（*cynomolgus*, cyno）、黑猩猩（*Pan troglodytes*）（*chimpanzee*, chimp）或狨猴（*Callithrix jacchus*）（*commonmarmoset*, marmoset）的相应抗原具有交叉反应性。

术语“抗 Nectin-4 抗体”和“结合 Nectin-4 的抗体”是指能够以足够的亲和力结合 Nectin-4 的抗体。在某些实施例中，与抗 Nectin-4 抗体结合的抗体具有以下平衡解离常数（KD）<约 1 μ M、<约 100 nM、<约 10 nM、<约 1 nM、<约 0.1 nM、<约 0.01 nM 或 <约 0.001 nM（例如 10^{-8} M 或更小、例如 10^{-8} M 至 10^{-9} M、例如 10^{-9} M 或更小）。在某些实施例中，抗 Nectin-4 抗体结合来自不同物种的 Nectin-4 中保守的 Nectin-4 表位。

术语“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指一种细胞毒性形式，其中分泌的 Ig 结合到某些细胞毒性细胞（例如，自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞）上的 Fc 受体(FcR)，使这些细胞毒性效应细胞与带有抗原的靶细胞特异性结合，随后用细胞毒素杀死靶细胞。抗体“武装”细胞毒性细胞，并且是此类杀伤作用所必需的。介导 ADCC 的主要细胞 NK 细胞仅表达 Fc γ RIII，而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。造血细胞上的 FcR 表达总结在 Ravetch 和 Kinet, 《免疫学年评》(Annu.Rev.Immunol.)9:457-92(1991)的第 464 页的表 3 中。为评估目标分子的 ADCC 活性，可进行体外 ADCC 分析，分析方法例如美国专利 No.5, 500, 362 或 5, 821, 337 中所述。用于此类测定的有效效应细胞

包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可选地, 目的抗体的 ADCC 活性也可以在体内评估, 例如, 在动物模型(诸如在 Clynes 等人, (USA)95:652-656(1998)中所公开的)中评估。

5 术语“抗体依赖性细胞吞噬作用”(“ADCP”)是指通过吞噬细胞(诸如巨噬细胞或树突状细胞)的内化作用消除抗体包被的靶细胞的机制。

术语“补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指诱导细胞死亡的机制, 其中靶标结合抗体的 Fc 效应子结构域结合并活化补体成分 C1q, 继而激活补体级联, 导致靶细胞死亡。补体的活化也可导致补体成分沉积在靶细胞表面上, 这些补体成分通过结合白细胞上的补体受体(例如, CR3)来促进 CDC。

10 术语“核酸”与术语“多核苷酸”在本文中可互换使用, 并且是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。所述术语涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸, 所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的, 具有与参考核酸相似的结合特性, 并且以类似于参考核苷酸的方式代谢。此类类似物的示例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性-甲基膦酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。“分离的”核酸指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。分离的核酸包括在下述细胞中含有的核酸分子, 所述细胞通常含有该核酸分子, 但该核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。“编码抗 Nectin-4 抗体的核酸”指编码抗体重链和轻链(或其片段)的一个或更多个核酸分子。

20 除非另有说明, 否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如, 简并密码子取代)和互补序列以及明确指明的序列。具体地, 如下详述, 简并密码子取代可以通过产生如下序列而获得, 在这些序列中, 一个或多个所选的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer 等, *Nucleic Acid Res.*19:5081, 1991; Ohtsuka 等, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; 和
25 Rossolini 等, *Mol. Cell. Probes*8:91-98, 1994)。

术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用, 指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物, 其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物, 以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

30 术语“裸抗体”指未与异源模块(例如细胞毒性模块)或放射性标记物缀合的抗体。裸抗体可以存在于药学配制剂中。

术语“同一性”、“序列同一性”或“氨基酸序列同一性”是指, 当对两条序列进行最佳比对时(必要时引入间隙, 以获取最大序列同一性百分比, 且将任何保守性取代视为序列同一性的一部分), 两条序列的氨基酸/核酸在等价位置
35 相同的程度(百分比)。为测定序列同一性百分比, 比对可以通过属于本领域公知的多种方法来实现, 诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign

(DNASTAR) 等。本领域技术人员可确定适用于测量比对的参数, 包括在所比较的序列全长上达成最大比对所需的任何算法。

术语“保守修饰的变体”或“保守性取代”指使用具有相似特征(例如, 电荷、侧链尺寸、亲水性/疏水性、骨架构型和刚性等)的其他氨基酸置换蛋白中的氨基酸, 使得通常可以做出这样的变化而不改变蛋白的生物活性。本领域技术人员知晓, 在通常情况下, 在多肽的非必需区域中的单氨基酸置换基本上不改变生物活性(参见例如, Watson 等, (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub.Co., p.224 (4th Ed.))。术语“保守修饰的变体”当适用核酸序列时, 保守修饰的变体是指那些编码相同或基本上相同的氨基酸序列的核酸, 或在该核酸不编码氨基酸序列的情况下, 是指基本相同的序列。由于遗传密码的简并性, 任何给定的蛋白质均可以由多个功能相同的核酸编码。例如, 密码子 GCA、GCC、GCG 和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此, 在密码子指定丙氨酸的每个位置, 该密码子可以改变为任何所述相应密码子而不改变编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”, 它们是保守修饰变异中的一种。本文中编码多肽的每个核酸序列也描述了核酸的每种可能的沉默变异。技术人员将认识到, 核酸中的每个密码子(除了 AUG--通常是甲硫氨酸的唯一密码子; 和 TGG--通常是色氨酸的唯一密码子)均可以被修饰以产生功能相同的分子。因此, 在每个所述序列中均隐含了编码多肽的核酸的每一种沉默变异。

术语“表达载体”或“表达构建体”是指适用于对宿主细胞进行转化, 且含有指导及/或控制(连同宿主细胞一起)与其可操作地连接的一个或多个异源编码区的表达的核酸序列的载体。表达构建体可以包括但不限于影响或控制转录、翻译且在存在内含子时影响与其可操作地连接的编码区的 RNA 剪接的序列。

如本文中所使用, “可操作地连接”意指该术语所适用的组分允许其在适合条件下执行其固有功能的关系。举例而言, 表达载体中与蛋白质编码序列“可操作地连接”的控制序列是与其连结, 从而在与该控制序列的转录活性兼容的条件下, 达成该蛋白质编码序列的表达。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用, 并且指已经导入外源核酸的细胞, 包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”, 其包括原代的经转化的细胞及自其衍生的后代, 而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同, 可以含有突变。本文中包括具有与在初始转化细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变体后代。宿主细胞包括原核和真核宿主细胞, 其中真核宿主细胞包括但不限于哺乳动物细胞、昆虫细胞系植物细胞和真菌细胞。示例性的宿主细胞如下: 中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NSO、SP2 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如, Hep G2)、A549 细胞、3T3 细胞和 HEK-293 细胞、巴氏毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、芬兰毕赤酵母(*Pichia finlandica*)、白

色念珠菌 (*Candida albicans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)。

如在本申请中所使用的,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以互换使用,包括此类细胞的后代。因而,词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试者细胞和来源于其的培养物,而与传代的次数无关。还应理解的是,由于有意或无意的突变,使得并非所有子代均具有完全相同的 DNA 内容物。包括与筛选出其的原始转化细胞具有相同功能或生物活性的突变子代。

现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法,如冷泉港的抗体实验技术指南,5-8 章和 15 章。公开所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 区加上一个或更多个人源 FR 区。人 FR 种系序列可以通过比对 IMGT 人类抗体可变区种系基因数据库和 MOE 软件,从 ImMunoGeneTics (IMGT) 的网站 <http://imgt.cines.fr> 得到,或者从免疫球蛋白杂志,2001ISBN012441351 上获得。

本披露工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如,编码重链和轻链的 cDNA 序列,可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染宿主细胞。作为一种更推荐的现有技术,哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化,特别是在 Fc 区的 N 端位点。通过表达与人 Nectin-4 特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如,用 A 或 G Sepharose FF 柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用 pH 梯度法洗脱结合的抗体,用 SDS-PAGE 检测抗体片段,收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体,也可以用常规方法去除,比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻,如-70℃,或者冻干。

“分离的”指纯化状态,并且在这种情况下意味着在指定的分子基本上不含其他生物分子,例如核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物或其他材料,例如细胞碎片和生长培养基。通常,术语“分离的”并不意图指完全不存在这些材料或不存在水、缓冲液或盐,除非它们以显著干扰如本文所述的化合物的实验或治疗用途的量存在。

术语“药物”是指可以改变或查明机体的生理功能及病理状态,可用以预防,诊断和治疗疾病的化学物质。药物包括细胞毒性药物。药物和毒物之间并无严格界限,毒物是指在较小剂量即对机体产生毒害作用,损害人体健康的化学物质,任何药物剂量过大都可产生毒性反应。

细胞毒性药物,即抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性药物原则上在足够高的浓度下都可以杀死肿瘤细胞,但是由于缺乏特异性,在杀伤肿瘤细胞的同时,也会导致正常细胞的凋亡,导致严重的副作用。细胞毒性药物包括毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒

素,放射性同位素(例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²和 Lu 的放射性同位素),化疗药物,抗生素和核溶酶。

术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团,其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团,优选含有 1 至 12 个(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 个)碳原子的烷基,更优选为含有 1 至 6 个碳原子的烷基。非限制性示例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基,及其各种支链异构体等。更优选的是含有 1 至 6 个碳原子的低级烷基,非限制性实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基可以在任何可使用的连接点上被取代,所述取代基优选独立地任选自 D 原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

术语“烷氧基”指-O-(烷基),其中烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性示例包括:甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选为一个或多个以下基团,其独立地选自 D 原子、卤素、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基。

术语“亚烷基”指饱和的直链或支链脂肪族烃基,其为从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基,其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团,优选含有 1 至 12 个(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 个)碳原子,更优选含有 1 至 6 个碳原子的亚烷基。亚烷基的非限制性示例包括但不限于亚甲基(-CH₂-)、1,1-亚乙基(-CH(CH₃)-)、1,2-亚乙基(-CH₂CH₂-)、1,1-亚丙基(-CH(CH₂CH₃)-)、1,2-亚丙基(-CH₂CH(CH₃)-)、1,3-亚丙

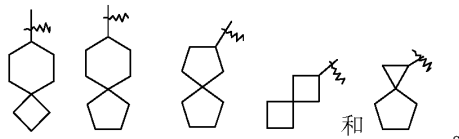
基(-CH₂CH₂CH₂-)、1,4-亚丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)等。亚烷基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基可以在任何可使用的连接点上被取代,所述取代基优选独立地任选自烯基、炔基、烷氧基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基和氧代基中的一个或多个取代基。

术语“烯基”指分子中含有至少一个碳碳双键的烷基化合物,其中烷基的定义如上所述。优选含有2至12个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12个)碳原子的烯基,更优选含有2至6个碳原子的烯基。烯基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选为一个或多个以下基团,其独立地选自烷氧基、卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

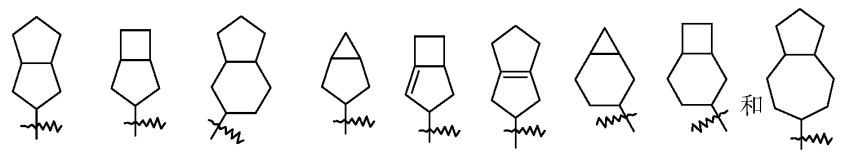
术语“炔基”指分子中含有至少一个碳碳三键的烷基化合物,其中烷基的定义如上所述。优选含有2至12个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12个)碳原子的炔基,更优选含有2至6个碳原子的炔基。炔基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选为一个或多个以下基团,其独立地选自烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基,环烷基环包含3至20个碳原子,优选包含3至12个(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11和12个)碳原子,优选包含3至8个碳原子,更优选包含3至6个碳原子。单环环烷基的非限制性示例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基和环辛基等;多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。

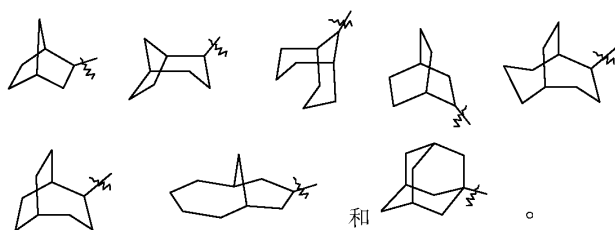
术语“螺环烷基”指5至20元,单环之间共用一个碳原子(称螺原子)的多环基团,其可以含有一个或多个双键。优选为6至14元(例如6、7、8、9、10、11、12、13和14),更优选为7至10元(例如7、8、9或10元)。根据环与环之间共用螺原子的数目将螺环烷基分为单螺环烷基、双螺环烷基或多螺环烷基,优选为单螺环烷基和双螺环烷基。更优选为3元/4元、3元/5元、3元/6元、4元/4元、4元/5元、4元/6元、5元/4元、5元/5元、5元/6元、6元/3元、6元/4元、6元/5元和6元/6元单螺环烷基。螺环烷基的非限制性示例包括:



术语“稠环烷基”指 5 至 20 元，系统中的每个环与体系中的其他环共享毗邻的一对碳原子的全碳多环基团，其中一个或多个环可以含有一个或多个双键。优选为 6 至 14 元（例如 6、7、8、9、10、11、12、13 和 14），更优选为 7 至 10 元（例如 7、8、9 或 10 元）。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环稠环烷基，优选为双环或三环，更优选为 3 元/4 元、3 元/5 元、3 元/6 元、4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/4 元、5 元/5 元、5 元/6 元、6 元/3 元、6 元/4 元、6 元/5 元和 6 元/6 元双环烷基。稠环烷基的非限制性示例包括：



术语“桥环烷基”指 5 至 20 元，任意两个环共用两个不直接连接的碳原子的全碳多环基团，其可以含有一个或多个双键。优选为 6 至 14 元（例如 6、7、8、9、10、11、12、13 和 14），更优选为 7 至 10 元（例如 7、8、9 或 10 元）。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环桥环烷基，优选为双环、三环或四环，更优选为双环或三环。桥环烷基的非限制性示例包括：



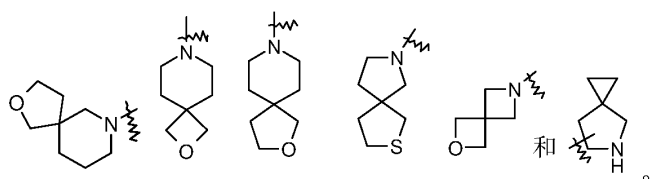
所述环烷基环包括如上所述的环烷基(包括单环、螺环、稠环和桥环)稠合于芳基、杂芳基或杂环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为环烷基，非限制性示例包括茚满基、四氢萘基和苯并环庚烷基等；优选茚满基和四氢萘基。

环烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

术语“杂环基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状取代基，其包含 3 至 20 个环原子，其中一个或多个环原子为选自氮、氧、硫、S(O)或 S(O)₂ 的杂原子，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分，其余环原子为碳。优选包含 3 至 12 个（例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 个）环原子，其中 1~4 个（例如 1、2、3 和 4 个）是杂原子；更优选包含 3 至 8 个环原子（例如 3、4、5、6、7 和 8 个），其中 1-3 是杂原子（例如 1、2 和 3 个）；更优选包含 3 至 6 个环原子，其中 1-3 个是杂原子；最优选包含 5 或 6 个环原子，其中 1-3 个是杂原子。单环杂

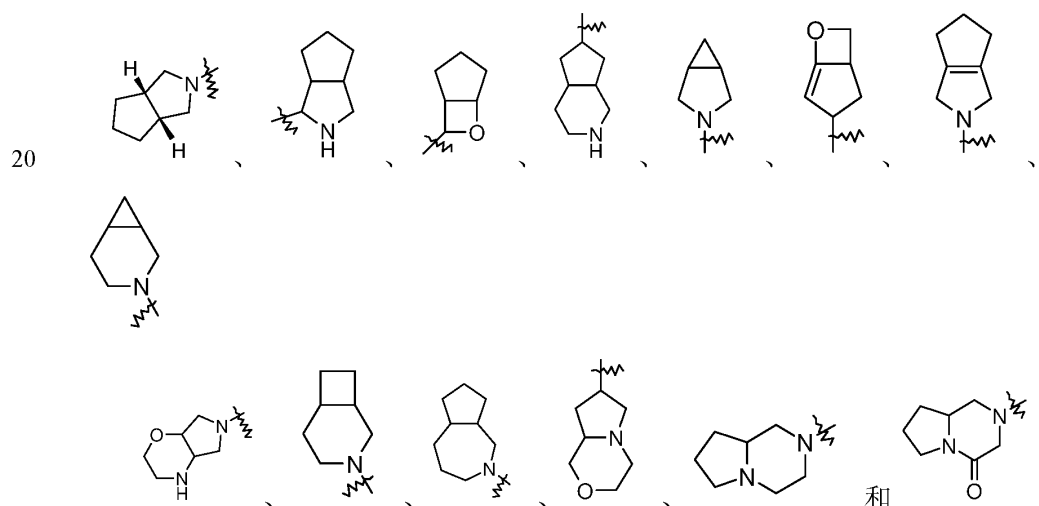
环基的非限制性示例包括吡咯烷基、四氢吡喃基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基和高哌嗪基等。多环杂环基包括螺环、稠环和桥环的杂环基。

术语“螺杂环基”指 5 至 20 元，单环之间共用一个原子(称螺原子)的多环杂环基团，其中一个或多个环原子为选自氮、氧、硫、S(O)或 S(O)₂ 的杂原子，其余环原子为碳。其可以含有一个或多个双键。优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元（例如 7、8、9 或 10 元）。根据环与环之间共用螺原子的数目将螺杂环基分为单螺杂环基、双螺杂环基或多螺杂环基，优选为单螺杂环基和双螺杂环基。更优选为 4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/5 元、5 元/6 元或 6 元/6 元单螺杂环基。螺杂环基的非限制性示例包括：



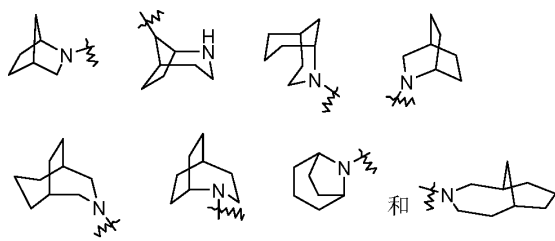
术语“稠杂环基”指 5 至 20 元，系统中的每个环与体系中的其他环共享毗邻的一对原子的多环杂环基团，一个或多个环可以含有一个或多个双键，其中一个或多个环原子为选自氮、氧、硫、S(O)或 S(O)₂ 的杂原子，其余环原子为碳。

15 优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元（例如 7、8、9 或 10 元）。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环稠杂环基，优选为双环或三环，更优选为 3 元/4 元、3 元/5 元、3 元/6 元、4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/4 元、5 元/5 元、5 元/6 元、6 元/3 元、6 元/4 元、6 元/5 元和 6 元/6 元双环稠杂环基。稠杂环基的非限制性示例包括：



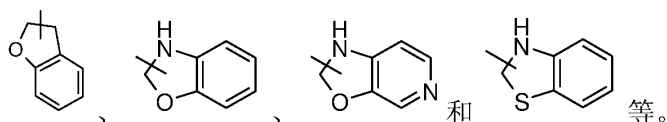
术语“桥杂环基”指 5 至 14 元，任意两个环共用两个不直接连接的原子
多环杂环基团，其可以含有一个或多个双键，其中一个或多个环原子为选自氮、

氧、硫、S(O)或 S(O)₂ 的杂原子，其余环原子为碳。优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元（例如 7、8、9 或 10 元）。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环桥杂环基，优选为双环、三环或四环，更优选为双环或三环。桥杂环基的非限制性示例包括：



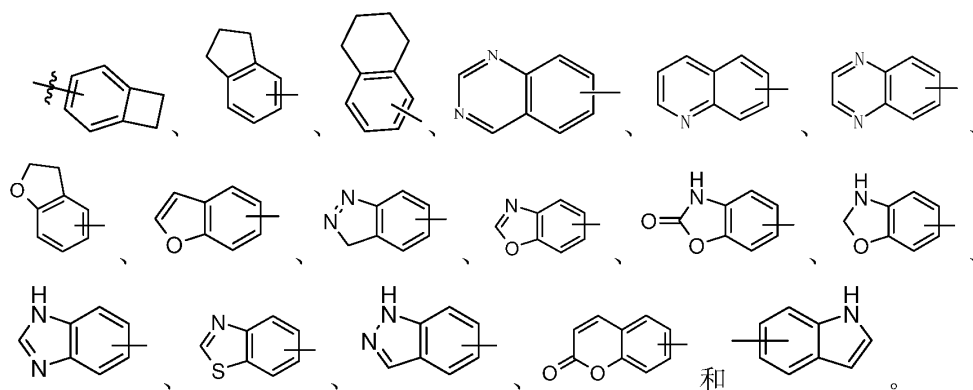
5

所述杂环基环包括如上所述的杂环基(包括单环、螺杂环、稠杂环和桥杂环)稠合于芳基、杂芳基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂环基，其非限制性示例包括：



10 杂环基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

15 术语“芳基”指具有共轭的 π 电子体系的 6 至 14 元全碳单环或稠合多环(稠合多环是共享毗邻碳原子对的环)基团，优选为 6 至 10 元，例如苯基和萘基。所述芳基环包括如上所述的芳基环稠合于杂芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为芳基环，其非限制性示例包括：

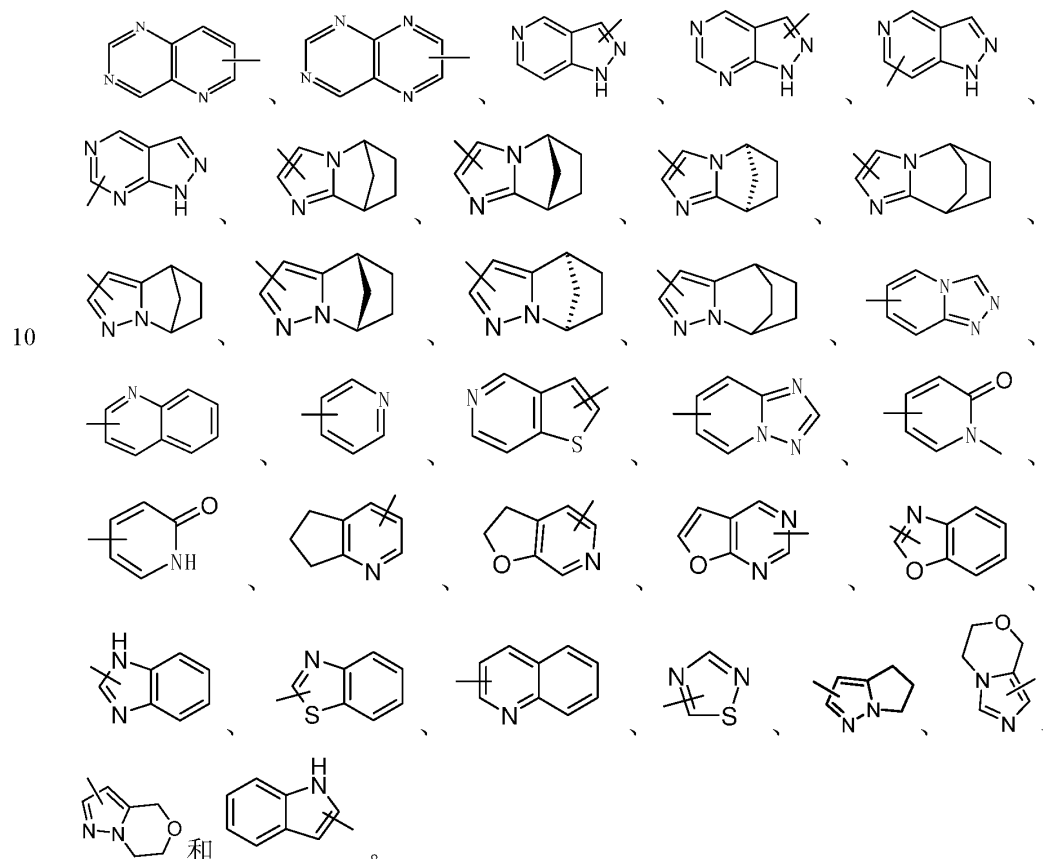


20

芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环

烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

术语“杂芳基”指包含 1 至 4 个杂原子（例如 1、2、3 和 4 个）、5 至 14 个环原子的杂芳族体系，其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基优选为 5 至 10 元（例如 5、6、7、8、9 或 10 元），更优选为 5 元或 6 元，例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、*N*-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、咪唑基、吡唑基、三唑基和四唑基等。所述杂芳基环包括如上述的杂芳基稠合于芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环，其非限制性示例包括：



杂芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

上述环烷基、杂环基、芳基和杂芳基包括从母体环原子上除去一个氢原子所衍生的残基，或从母体的相同环原子或两个不同的环原子上除去两个氢原子所衍生的残基即“二价环烷基”、“二价杂环基”、“亚芳基”或“亚杂芳基”。

术语“氨基保护基”是为了使分子其它部位进行反应时氨基保持不变，用易于脱去的基团对氨基进行保护。非限制性实施例包含(三甲基硅)乙氧基甲基、四

氢吡喃基、叔丁氧羰基 (Boc)、乙酰基、苄基、烯丙基、对甲氧苄基和叔丁基二甲基硅基 (TBS) 等。这些基团可任选地被选自卤素、烷氧基或硝基中的 1-3 个取代基所取代。

术语“羟基保护基”是指通常用于阻断或保护羟基而反应在化合物的其它官能团上进行的羟基衍生物。作为示例，优选地，所述的羟基保护基可以是(C₁₋₁₀ 烷基或芳基)₃硅烷基，例如：三乙基硅基，三异丙基硅基，叔丁基二甲基硅基(TBS) 和叔丁基二苯基硅基等；可以是 C₁₋₁₀ 烷基或取代烷基，优选烷氧基或芳基取代的烷基，更优选 C₁₋₆ 烷氧基取代的 C₁₋₆ 烷基或苯基取代的 C₁₋₆ 烷基，最优选 C₁₋₄ 烷氧基取代的 C₁₋₄ 烷基，例如：甲基，叔丁基，烯丙基，苄基，甲氧基甲基(MOM)，乙氧基乙基和 2-四氢吡喃基(THP)等；可以是(C₁₋₁₀ 烷基或芳香基)酰基，例如：甲酰基，乙酰基，苯甲酰基和对硝基苯甲酰基等；可以是(C₁₋₆ 烷基或 6 至 10 元芳基)磺酰基；也可以是(C₁₋₆ 烷氧基或 6 至 10 元芳基氧基)羰基。

术语“环烷基氧基”指环烷基-O-，其中环烷基如上所定义。

术语“杂环基氧基”指杂环基-O-，其中杂环基如上所定义。

术语“烷基硫基”指烷基-S-，其中烷基如上所定义。

术语“卤代烷基”指烷基被一个或多个卤素取代，其中烷基如上所定义。

术语“卤代烷氧基”指烷氧基被一个或多个卤素取代，其中烷氧基如上所定义。

术语“氘代烷基”指烷基被一个或多个氘原子取代，其中烷基如上所定义。

术语“羟烷基”指被一个或多个羟基取代的烷基，其中烷基如上所定义。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

术语“羟基”指-OH。

术语“巯基”指-SH。

术语“氨基”指-NH₂。

术语“氰基”指-CN。

术语“硝基”指-NO₂。

术语“氧代基”指“=O”。

术语“羰基”指 C=O。

术语“羧基”指-C(O)OH。

术语“羧酸酯基”指-C(O)O(烷基)、-C(O)O(环烷基)、(烷基)C(O)O-或(环烷基)C(O)O-，其中烷基和环烷基如上所定义。

“抗体-药物偶联物 (antibody drug conjugate, ADC)”是把抗体通过连接单元与具有生物活性的细胞毒素或具有细胞杀伤活性的小分子药物相连。

本披露所描述的抗体或抗体片段可以通过任何方式偶联至效应分子。举例来说，抗体或抗体片段可以通过化学或重组方式附接至细胞毒性药物。制备融合物或偶联物的化学方式在本领域中是已知的并且可以用于制备免疫偶联物。用于偶

联抗体或抗体片段和药物的方法必须能够连接抗体与细胞毒性药物而不会干扰抗体或抗体片段结合至靶分子的能力。

在一个实施方案中,抗体和细胞毒性药物都是蛋白质并且可以使用本领域中熟知的技术偶联。存在本领域中所公开的数百种交联剂,其可以偶联两种蛋白质。

- 5 交联剂一般基于在抗体或细胞毒性药物上可用或插入的反应官能团来选择。另外,如果不存在反应基团,那么可以使用光可活化交联剂。在某些情况下,可能需要在抗体与细胞毒性药物之间包括间隔子。本领域中已知的交联剂包括同型双功能剂:戊二醛、二甲基己二亚酰胺化物和双(重氮基联苯胺),以及异型双功能剂:间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺和磺基-间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺。

- 10 可以用于使效应分子偶合至抗体片段的交联剂包括例如 TPCH(S-(2-硫代吡啶基)-L-半胱氨酸酰肼)和 TPMPH(S-(2-硫代吡啶基)巯基-丙酰肼)。TPCH 和 TPMPH 在先前已经通过温和高碘酸盐处理而氧化的糖蛋白的碳水化合物部分反应,由此在交联剂的酰肼部分与高碘酸盐产生的醛之间形成腙键。异型双功能交联剂 GMBS(N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)-琥珀酰亚胺)和 SMCC(琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷)与伯胺反应,由此将马来酰亚胺基引入组分上。这个马来酰亚胺基随后可以与另一种组分上的可以由交联剂引入的巯基反应,由此在组分之间形成稳定的硫醚键。如果组分之间的位阻干扰任一种组分的活性,那么可以使用交联剂,将长的间隔臂引入组分之间,诸如 3-(2-吡啶基二
- 15 巯基)丙酸 n-琥珀酰亚胺酯(SPDP)。因此,存在许多适合的交联剂,其可以被使用并且各自取决于其对最佳免疫偶联物产量的影响来选择。

- 载药量,也称药物抗体比例(Drug-to-Antibody Ratio, DAR),即 ADC 中每个抗体所偶联的药物的平均数量。其可在例如每个抗体偶联约 1 至约 10 个药物的范围内,并且在某些实施例,在每个抗体偶联约 1 至约 8 个药物的范围内,优选自 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 3-4, 3-5, 5-6, 5-7, 5-8 和 6-8 的范围。示例性的,载药量可以为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 的均值。本披露的 ADC 通式包括与前述一定范围内的抗体-药物偶联物的集合。在本披露的实施方式中,载药量可表示为 n,是小数或整数。可用常规方法如 UV/可见光光谱法,质谱, ELISA 试验和 HPLC 测定载药量。

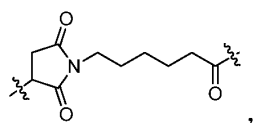
- 30 术语“接头单元”或“连接片段”或“连接单元”是指一端与抗体或其抗原结合片段连接而另一端与药物相连的化学结构片段或键,也可以连接其他接头后再与药物相连。

- 术语接头可以包含一种或多种接头构件。示例性的接头构件包括 6-马来酰亚胺基己酰基(“MC”)、马来酰亚胺基丙酰基(“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”或“vc”)、丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”)、对氨基苄氧羰基(“PAB”)、及那样源自与接头试剂的偶联的: N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(“SPP”)、
- 35

N-琥珀酰亚氨基 4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1 羧酸酯(“SMCC”, 在本文中也称作“MCC”)和 N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(“SIAB”)。接头可以包括延伸物、间隔物和氨基酸单元, 可以通过本领域已知方法合成, 诸如 US2005-0238649A1 中所记载的。接头可以是便于在细胞中释放药物的“可切割接头”。例如, 可使用酸不稳定接头(例如脲)、蛋白酶敏感(例如肽酶敏感)接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头(Chari 等, Cancer Research 52: 127-131(1992); 美国专利 No.5, 208, 020)。

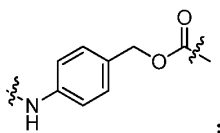
接头组件包括但不限于:

MC=6-马来酰亚氨基己酰基, 结构如下:



Val-Cit 或“vc”=缬氨酸-瓜氨酸(蛋白酶可切割接头中的示例二肽),
瓜氨酸=2-氨基-5-脲基戊酸,

PAB 基团为对氨基苄氧羰基(“自我牺牲”接头组件的示例), 其结构如下:



Me-Val-Cit=N-甲基-缬氨酸-瓜氨酸(其中接头肽键已经修饰以防止其受到组织蛋白酶 B 的切割),

MC(PEG)6-OH=马来酰亚氨基己酰基-聚乙二醇(可附着于抗体半胱氨酸),

SPP=N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯,

SPDP=N-琥珀酰亚氨基 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯,

SMCC=琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯,

IT=亚氨基硫烷,

本披露的一个实施方式中, 细胞毒性药物通过连接单元偶联在抗体的巯基上。

可以用以下非限制性方法控制配体药物偶联物的载量, 包括:

- (1) 控制连接试剂和单抗的摩尔比,
- (2) 控制反应时间和温度,
- (3) 选择不同的反应试剂。

“任选地”或“任选”是指意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生, 该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如“任选的被卤素或者氰基取代的 C₁₋₆ 烷基”是指卤素或者氰基可以但不必须存在, 该说明包括烷基被卤素或者氰基取代的情形和烷基不被卤素和氰基取代的情形。

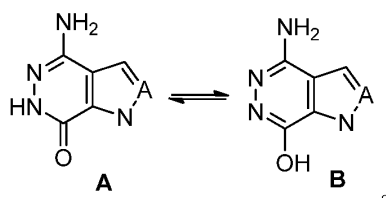
“取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选为 1~6 个，更优选为 1~3 个氢原子彼此独立地被相应数目的取代基取代。本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下（通过实验或理论）确定可能或不可能的取代。例如，具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和（如烯属）键的碳原子结合时可能是不稳定的。

5 “可药用盐”是指本披露化合物的盐，可选自无机盐或有机盐。这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性，且具有应有的生物活性。可以在化合物的最终分离和纯化过程中，或通过使合适的基团与合适的碱或酸反应来单独制备盐。通常用于形成药学上可接受的盐的碱包括无机碱，例如氢氧化钠和氢氧化钾，以及有机碱，例如氨。通常用于形成药学上可接受的盐的酸包括无机酸以及有机酸。

10 本披露中的抗体-药物偶联物浓度以蛋白的浓度计，即以抗体-药物偶联物中抗体部分的浓度计。

针对药物或药理学活性剂而言，术语“治疗有效量”是指无毒的但能达到预期效果的药物或药剂的足够用量。有效量的确定因人而异，取决于受体的年龄和一般情况，也取决于具体的活性物质，个案中合适的有效量可以由本领域技术人员根据常规试验确定。

本披露的化合物和中间体还可以以不同的互变异构体形式存在，并且所有这样的形式包含于本披露的范围内。术语“互变异构体”或“互变异构体形式”是指可经由低能垒互变的不同能量的结构异构体。例如，质子互变异构体（也称为质子转移互变异构体）包括经由质子迁移的互变，如酮-烯醇及亚胺-烯胺、内酰胺-内酰亚胺异构化。内酰胺-内酰亚胺平衡示例是在如下所示的 A 和 B 之间。



本披露中的所有化合物可以被画成 A 型或 B 型。所有的互变异构形式在本披露的范围内。化合物的命名不排除任何互变异构体。

25 “前药”是指可以在生理条件下，例如通过在血液中水解，在体内转化以产生生活性原药化合物。

本文所用的术语“药学上可接受的”是指这些化合物、材料、组合物和/或剂型，在合理的医学判断范围内，适用于与受试者组织接触而没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症，具有合理的获益/风险比，并且对预期的用途是有效。

30 常规的药物组合物的制备见中国药典。

本文所使用的，单数形式的“一个”、“一种”和“该”包括复数引用，反之亦然，除非上下文另外明确指出。

“约”是指处于如本领域的普通技术人员所确定的特定值的可接受误差范围之内，其将部分取决于所述值是如何测量或测定的，即所述测量系统的限制。在特定测定、结果或实施方案的上下文中，除非实施例或说明书其它地方内另有明确说明，否则“约”意指在根据本领域惯例的一个标准偏差之内。

5 术语“药学上可接受的载体”或“可药用的载体”指药学配制剂中与活性成分不同的，且对受试者无毒的成分。药学可接受载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

10 术语“包装插页”用于指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明书，其包含关于适应证、用法、剂量、施用、组合疗法、禁忌症的信息和/或关于使用这样的治疗产品的警告。

15 术语“受试者”或“个体”包括人类和非人类动物。非人动物包括所有脊椎动物（例如哺乳动物和非哺乳动物）例如非人灵长类（例如，食蟹猴）、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非指出时，否则所述术语“患者”或“受试者”在本文中可互换地使用。如本文所使用的，术语“食蟹猴（cyno）”或“食蟹猴（cynomolgus）”是指食蟹猴（*Macaca fascicularis*）。在某些实施方案中，个体或受试者是人。

20 术语“赋形剂”是在药物制剂中除主药以外的附加物，也可称为辅料。如片剂中的粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂；半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分；液体制剂中的防腐剂、抗氧化剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂、着色剂等均可称为赋形剂。

25 术语“稀释剂”又称填充剂，其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小，而且减少主要成分的剂量偏差，改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时，需加入吸收剂吸收油性物，使保持“干燥”状态，以利于制成片剂。如淀粉、乳糖、钙的无机盐、微晶纤维素等。

30 术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

35 药物组合物可以是无菌注射水溶液形式。可在使用的可接受的溶媒和溶剂中有水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。无菌注射制剂可以是其中活性成分溶于油相的无菌注射水包油微乳。例如将活性成分溶于大豆油和卵磷脂的混合物中。然后将油溶液加入水和甘油的混合物中处理形成微乳。可通过局部大量注射，将注射液或微乳注入受试者的血流中。或者，最好按可保持本披露化合物恒定循环浓度的方式给予溶液和微乳。为保持这种恒定浓度，可使用连续静脉内递药装置。这种装置的示例是 Deltec CADD-PLUS. TM. 5400 型静脉注射泵。

药物组合物可以是用于肌内和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可

按已知技术,用上述那些适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混悬液,例如 1, 3-丁二醇中制备的溶液。此外,可方便地用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。为此目的,可使用包括合成甘油单或二酯在内的任何调和固定油。

5 此外,脂肪酸例如油酸也可以制备注射剂。

“施用”或“给予”,当其应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。

术语“样本”是指从受试者分离的类似流体、细胞、或组织的采集物,以及存在于受试者体内的流体、细胞或组织。示例性样本为生物流体,诸如血液、血清和浆膜液、血浆、淋巴液、尿液、唾液、囊液、泪液、排泄物、痰、分泌组织和器官的粘膜分泌物、阴道分泌物、腹水、胸膜、心包、腹膜、腹腔和其它体腔的流体、由支气管灌洗液收集的流体、滑液、与受试者或生物来源接触的液体溶液,例如细胞和器官培养基(包括细胞或器官条件培养基)、灌洗液等,组织活检样本、细针穿刺、手术切除的组织、器官培养物或细胞培养物。

10 术语“药学上可接受的盐”或“可药用盐”是指本披露抗体-药物偶联物的盐,或本披露中所述的化合物的盐,这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性,且具有应有的生物活性,本披露抗体-药物偶联物至少含有一个氨基,因此可以与酸形成盐。

20 “治疗(treatment 或 treat)/处理”(及其语法变型)指试图改变所治疗个体的天然过程的临床干预,并且可以为了预防或者在临床病理学的过程期间实施。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或再发生,减轻症状,减轻/减少疾病的任何直接或间接病理后果,预防转移,降低疾病进展速率,改善或减轻疾病状态,和消退或改善的预后。在一些实施方案中,使用本披露的抗体来延迟疾病的形成或减缓疾病的进展。

25 “有效量”一般是足以降低症状的严重程度及/或频率、消除这些症状及/或潜在病因、预防症状及/或其潜在病因出现及/或改良或改善由疾病状态引起或与其相关的损伤(例如肺病)的量。在一些实施例中,有效量是治疗有效量或预防有效量。“治疗有效量”是足以治疗疾病状态或症状、尤其与该疾病状态相关的状态或症状,或者以其他方式预防、阻碍、延迟或逆转该疾病状态或以任何方式与该疾病相关的任何其他不理想症状的进展的量。“预防有效量”是当给予受试者时将具有预定预防效应,例如预防或延迟该疾病状态的发作(或复发),或者降低该疾病状态或相关症状的发作(或复发)可能性的量。完全治疗或预防未必在给予一个剂量之后便发生,可能在给予一系列剂量之后发生。因而,治疗或预防有效量可以一次或多次给予的方式给予。“治疗有效量”和“预防有效量”可取决于以下因素变化:诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及治疗剂或治疗剂组合

在个体中引发期望的应答的能力。有效治疗剂或治疗剂组合的示例性指标包括例如受试者改善的健康状况。

在以上说明书中提出了本披露一种或多种实施方案的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本披露，但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书，本披露的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中，除非上下文中有清楚的另外指明，单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语都具有本披露所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本披露的优选实施方案。这些实施例不应以任何方式理解为限制本披露的范围，本披露的范围由权利要求书限定。

具体实施方式

以下结合实施例用于进一步描述本发明，但这些实施例并非限制本发明的范围。

本披露实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley Interscience，NY。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。本披露将申请 WO2020063676 A1 中的全部内容引入本申请。

实施例

实施例 1: Nectin-4 高表达细胞株构建

将 PBABE-Nectin4 慢病毒表达载体质粒与 pVSV-G, pGag-pol 慢病毒系统包装载体用 Lipofectamine 3000 转染试剂转染至病毒包装细胞 293T 中，收集含有病毒的培养基上清，过滤并进行超高速离心，使用浓缩后的病毒感染中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1，经嘌呤霉素筛选两至三周，再进行 FACS 单细胞分选。

通过 FACS 检测慢病毒感染的 CHO-K1 细胞表面的 Nectin-4 表达，挑选出 Nectin-4 表达量高的单克隆细胞株，扩大培养，冻存备用。

人 Nectin-4 氨基酸序列 (UniProtKB - Q96NY8-1)

MPLSLGAEMWGPEAWLLLLLLLLASFTGRCPAGELETSDVVTVVLGQDAKLPC
FYRGDSGEQVGQVAWARVDAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVEQPPPP
RNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRRLRVLPPLPSLNPGPA
LEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVP
SRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVRGLEDQNLWHIGREG
AMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVS
NEFSSRDSQVTVDVLDLPQEDSGKQVDLVASVVVVGVIAALLFCLLVVVVVL

MSRYHRRKAQQMTQKYEEELTLTRENSIRRLHSHHTDPRSQPEESVGLRAEG
 HPDSLKD NSSCSVMSEEPEGRSYSTLT TVREIETQTELLSPGSGRAEEEEEDQDE
 GIKQAMNHFVQENGLTRAKPTGNGIYINGRHLV SEQ ID NO: 1

阳性对照抗体 EV201 参照 (WO2012047724, 第 115 页) 制备。其中

5 EV201(enfortumab vedotin)的重链和轻链氨基酸序列如下:

EV201 重链:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLEWVSYIS
 SSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGM
 DVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVTS
 10 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
 LVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 15 NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 2

EV201 轻链:

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGIGWLAWYQQKPGKAPKFLIYAAS
 LQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIK
 20 RTVAAPS FIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC

SEQ ID NO: 3

25 实施例 2: 抗人 Nectin-4 单克隆抗体的筛选

利用全人源半合成噬菌体抗体库和抗原 Biotinylated Human Nectin-4 (购买
 于北京百普赛斯生物科技股份有限公司, 货号: NE4-H82E7), 经过淘选后, 采
 用 ELISA 方法进行噬菌体检测, 获得阳性克隆。将阳性克隆测序, 获得序列后,
 将阳性克隆序列插入蛋白表达载体 Phr-IgG 中, 并在 HEK293 和 Expi-CHO-S 上
 30 进行表达。纯化后进行 FACS 和内吞活性验证实验, 最终挑选出全人源抗体分子
 NEC49。

全人源抗体分子 NEC49 的可变区序列如下:

NEC49 重链可变区:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIY
 35 SGGSTIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR HGGDSGS
 WSYYYYGMDVWGQGT TTVTVSS

SEQ ID NO: 6

NEC49 轻链可变区:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 7

表 2. Chothia 编号规则获得的 CDR 序列

抗体	NEC49	SEQ ID NO
重链 CDR1	GFTFSSY	SEQ ID NO: 8
重链 CDR2	YSGGS	SEQ ID NO: 9
重链 CDR3	HGGDSGSWSYYYYGMDV	SEQ ID NO: 10
轻链 CDR1	RASQSISSYLN	SEQ ID NO: 11
轻链 CDR2	AASSLQS	SEQ ID NO: 12
轻链 CDR3	QQSYSTPLT	SEQ ID NO: 13

5

表 3. IMGT 编号规则获得的 CDR 序列

抗体	NEC49	SEQ ID NO
重链 CDR1	GFTFSSYA	SEQ ID NO: 14
重链 CDR2	IYSGGST	SEQ ID NO: 15
重链 CDR3	TRHGGDSGSWSYYYYGMDV	SEQ ID NO: 16
轻链 CDR1	QSISSY	SEQ ID NO: 17
轻链 CDR2	AAS	SEQ ID NO: 18
轻链 CDR3	QQSYSTPLT	SEQ ID NO: 13

表 4. Kabat 编号规则获得的 CDR 序列

抗体	NEC49	SEQ ID NO
重链 CDR1	SYAMS	SEQ ID NO: 19
重链 CDR2	AIYSGGSTYYADSVKG	SEQ ID NO :20
重链 CDR3	HGGDSGSWSYYYYGMDV	SEQ ID NO: 10
轻链 CDR1	RASQSISSYLN	SEQ ID NO: 11
轻链 CDR2	AASSLQS	SEQ ID NO: 12
轻链 CDR3	QQSYSTPLT	SEQ ID NO: 13

10 NEC49 的重链恒定区：
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
15 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 4

NEC49 的轻链恒定区：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

5

SEQ ID NO: 5

NEC49 重链：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIY
SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHHGGDSGS
WSYYYYGMDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
10 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLT
15 VDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 21

NEC49 轻链：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTRLEIKRT
20 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 22

实施例 3：ADC 分子的构建

25

ADC 载药量测定

用反相高效液相色谱（RP-HPLC）测定 ADC 的载药量。

1、测定方法：

裸抗和待测样品 ADC（浓度为 1 mg/mL），加入 4 μ LDDT（sigma）还原，
37°C 水浴 1 小时，结束后取出到内插管中。使用高效液相色谱仪 Agilent 1200 进
30 行检测，色谱柱选用 Agilent PLRP-S 1000A 8 μ m 4.6*250 mm，柱温：80°C；DAD
检测器波长 280 nm；流速：1 mL/分钟；进样量为：40 μ L；之后通过样品与裸抗
的谱图比对，区分出轻、重链的位置，然后对检测样品的谱图进行积分，计算出
DAR 值。

2、溶液配制

35

1) 0.25M DTT 溶液：

2) 流动相 A（0.1% TFA 水溶液）：

3) 流动相 B（0.1% TFA 乙腈溶液）：

3、数据分析

通过样品与裸抗的谱图比对，区分出轻、重链的位置，然后对检测样品的谱图进行积分，计算出载药量 DAR 值。

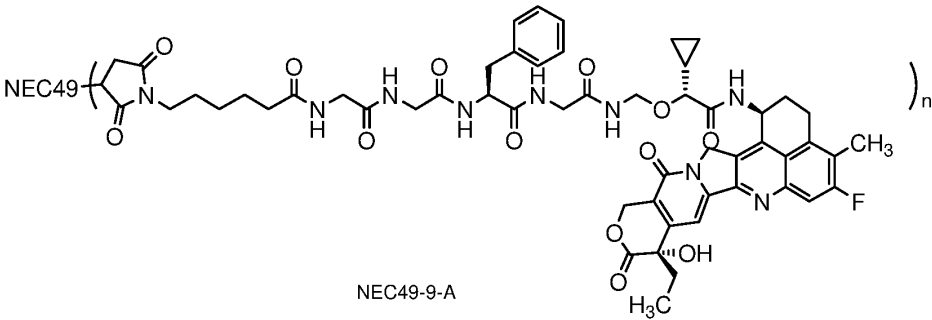
计算公式如下：

名称	连接药物数
LC	0
LC+1	2
HC	0
HC+1	2
HC+2	4
HC+3	6

- 5 LC 峰面积总和=LC 峰面积+LC+1 峰面积
 HC 峰面积总和=HC 峰面积+HC+1 峰面积+ HC+2 峰面积+ HC+3 峰面积
 LC DAR=Σ (连接药物数*峰面积百分比)/ LC 峰面积总和
 HC DAR=Σ (连接药物数*峰面积百分比)/ HC 峰面积总和
 DAR= LC DAR+ HC DAR

10

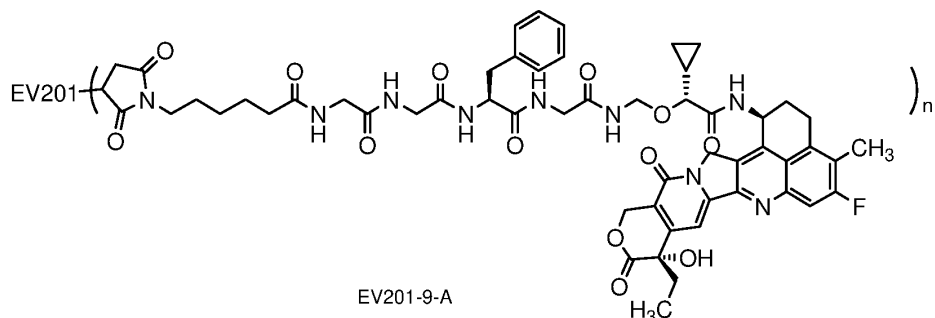
实施例 4. ADC-1



在 37 °C 条件下，向抗体 NEC49 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液；10.0 mg/mL，6.4 mL，432 nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦酸盐(TCEP-HCl)的水溶液(10 mM，130 μL，1300 nmol)，置于水浴振荡器，于 37 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 9-A (参考 WO2020063676 第 58-60 页，实施例 9 的 9-A 制备，5.6mg，5214 nmol)溶解于 300 μL DMSO 中，加入到上述反应液中，置于水浴振荡器，于 25 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到标题偶联物通式 NEC49-9-A 的示例性产物 ADC-1 的 PBS 缓冲液(2.89 mg/mL，21 mL)，于 4 °C 冷藏储存。RP-HPLC 计算载量平均值：n=4.90。

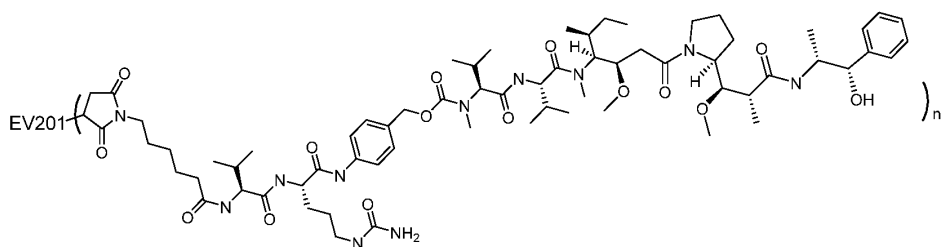
实施例 5. ADC-2



在 37 °C 条件下,向抗体 EV201 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 1.63 mL, 110 nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP-HCl)的水溶液(10 mM, 28.5 μ L, 285 nmol),置于水浴振荡器,于 37 °C 下振荡反应 3 小时,停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 **9-A** (1.18mg, 1100 nmol)溶解于 90 μ L DMSO 中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于 25 °C 下振荡反应 3 小时,停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液,含 0.001M 的 EDTA),得到标题偶联物通式 EV201-9-A 的示例性产物 **ADC-2** 的 PBS 缓冲液(1.12 mg/mL, 12 mL),于 4 °C 冷藏储存。RP-HPLC 计算载量平均值: n=3.90。

实施例 6. ADC-3



在 37 °C 条件下,向抗体 EV201 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 3.67 mL, 248 nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP-HCl)的水溶液(10 mM, 64.4 μ L, 644 nmol),置于水浴振荡器,于 37 °C 下振荡反应 3 小时,停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 VcMMAE(瀚香生物科技, CAS 646502-53-6, 3.3mg, 2480 nmol)溶解于 150 μ L DMSO 中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于 25 °C 下振荡反应 3 小时,停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液,含 0.001M 的 EDTA),得到标题偶联物通式 EV201-MMAE 的示例性产物 **ADC-3** 的 PBS 缓冲液(2.71 mg/mL, 14 mL),

于 4℃冷藏储存。RP-HPLC 计算载量平均值：n=4.09。

生物学测试

测试例 1：抗体蛋白水平亲和力和动力学实验

5 通过 Biacore T200（GE）分析抗 Nectin-4 抗体的表征亲和力及结合动力学。
用 Protein A 生物传感芯片(Cat. # 29127556, GE)亲和捕获 IgG 抗体，然后于芯片
表面流经稀释在 HBS-EP 缓冲液(pH 7.4) (Cat. # BR-1001-88, GE)中的一系列浓
度梯度的人 Nectin-4 His(Cat.#19771-H08H, 义翘神州)抗原。追踪抗原-抗体结合
动力学 3 分钟并追踪解离动力学 10 分钟，用 Biacore T200 仪器实时检测反应信
10 号获得结合和解离曲线。在每个实验循环解离完成后，用 10 mM Gly-HCl pH 1.5
(Cat. # BR-1003-54, GE)将生物传感芯片洗净再生。使用 GE 的 BIAevaluation 软
件以 1:1（Langmuir）结合模型分析所得数据，以此法测定的 ka (kon)、kd (koff)
和 KD 值显示于表 5。

表 5. Biacore 测定的抗体的亲和力

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
EV201	7.09E+05	6.61E-03	9.33E-09
NEC49	3.67E+05	1.89E-03	5.15E-09

15 结论：

NEC49 与人 Nectin-4 蛋白的亲和力略优于对照分子 EV201。

测试例 2：抗体体外细胞结合实验

将 Nectin4-CHOK1/T47D/MDA-MB-468 细胞用 FACS 缓冲液（2%胎牛血清
20 （Gibco, 10099141）pH7.4 PBS（Sigma, P4417-100TAB）制备成 1×10⁶/mL 的
细胞悬液，100μL/孔加入 96 孔圆底板中。离心去除上清后加入 50μL/孔用 FACS
缓冲液稀释的不同浓度待测抗体，放于 4℃冰箱中避光孵育 1 小时。以 FACS 缓
冲液 500g 离心洗涤 3 次后，加入工作浓度的 Alexa Fluor 488 Goat anti-Human IgG
(H+L) (invitrogen, A-11013)，放于 4℃冰箱中避光孵育 40 分钟。以 FACS 缓冲
25 液 500g 离心洗涤 3 次后，在 BD FACSCantoII 流式细胞仪上检测几何平均数荧
光强度，计算抗体对表达 Nectin-4 的细胞结合 EC₅₀ 值。结果见表 6，以及图 1、
图 2 和图 3。

表 6. 抗体与不同细胞结合活性

细胞	Nectin4-CHOK1		T47D		MDA-MB-468	
抗体	NEC49	EV201	NEC49	EV201	NEC49	EV201
最大荧光值	82484	65807	13403	12638	10191	9867
EC ₅₀ (nM)	0.78	0.94	0.07	0.26	0.06	0.23

结论：

NEC49 与多种表达 Nectin-4 的细胞系有结合活性, 并且优于对照分子 EV201。

测试例 3: DT3C 抗体内吞实验

5 本实验的目的是根据 DT3C 蛋白进入细胞后,活化的 DT 对细胞进行杀伤,间接反映了 Nectin-4 抗体的内吞情况。根据 IC_{50} 和最大杀伤值来评价抗体的体内外吞活性。

DT3C 是重组表达的融合蛋白，由白喉毒素的 Fragment A（仅毒素部分）和 G 群链球菌的 3C 片段（IgG 结合部分）融合而成，该蛋白能够与抗体的 Fc 部分高度亲和，在抗体发生内吞时一同进入细胞，在胞内弗林蛋白酶的作用下，释放出具有毒性的 DT，DT 能够抑制 EF2-ADP 核糖基化的活性，阻断蛋白翻译过程，最终导致细胞死亡。而未进入细胞的 DT3C 则不具有杀伤细胞的活性。根据细胞杀伤情况来评价抗体的内吞活性。

用含 20% low IgG FBS 的新鲜细胞培养基配制 Nectin4-CHOK1 细胞悬液，
15 细胞密度为 2×10^4 细胞/mL，以 50 μ L/孔加入细胞培养板 3903 中，5%二氧化碳
37 $^{\circ}$ C 16 小时培养。用无血清培养基将 DT3C 稀释成 1.6 μ M，用无血清培养基将
抗体稀释成 266.4nM，将 80 μ L DT3C 和 80 μ L 抗体按照 1:1 的体积混匀，室温下
静置孵育 30 分钟。DT3C 摩尔浓度为抗体摩尔浓度的 6 倍。

用无血清培养基 4 倍梯度稀释 DT3C 和抗体混合物, 共 8 个梯度, 第 9 和 10 个点为纯培养基。C25-IgG1 为同型 IgG1 阴性对照组。取 50 μ L 稀释好的混合物加入 50 μ L 的细胞中, 培养箱中孵育三天。每孔加入 50 μ L CTG, 室温下避光孵育 10 分钟, 将白色底膜贴在细胞培养板底部, 置于酶标仪 Victor 3 上读取化学发光值。结果见图 4 (C25-IgG1 为同型 IgG1 阴性对照组, DT3C 为阴性对照组) 和表 7。

25 表 7. 抗体的体外内吞活性

抗体	NEC49	EV201
最大杀伤值	100.55%	92.59%
IC ₅₀ (nM)	0.43	0.50

结论:

NEC49 用 DT3C 的方法在 Nectin4-CHOK1 细胞上具有内吞活性, 并且略优于对照分子 FV201。

测试例 4：pHrodo 抗体内吞实验

本实验的目的是根据染料被内化后荧光信号变化来反映 Nectin-4 抗体的内吞情况。根据荧光信号的强弱来评价抗体的体外内吞活性。

与 pH 敏感的 pHrodo iFL 染料偶联结合的 Fab 片段可直接结合至 Nectin-4 抗

体的Fc区，且不影响抗体的抗原识别。pHrodo iFL染料在中性pH值时几乎不发荧光，在Nectin-4抗体发生内吞时，染料同时被内化，随着pH降低，荧光信号会逐渐增强。根据荧光信号的增强情况来评价抗体的内吞活性。

5 Nectin4-CHOK1克隆3细胞用DMEM/F12+10%FBS+10μg/mL嘌呤霉素培养，实验第一天用含新鲜细胞培养基制取细胞悬液，密度为2×10⁵细胞/mL，以100μL/孔加入96孔细胞培养板3903中，5%二氧化碳37℃培养24小时。

4×抗体配制：用无FBS的培养基将抗体母液稀释10倍配成培养液(Medium solution)，再将培养液稀释到4×Dosing Solution(80nM)，抗体终浓度为20nM。

10 4×Zenon™ pHrodo™ iFL IgG标记试剂配制：用无FBS的培养基将pHrodo™标记试剂母液稀释到4×浓度(240nM)，终浓度为60nM。将上述4×抗体溶液和4×pHrodo™标记试剂溶液，等体积混合到一起，室温孵育10分钟。取50μL混合液加入到150μL无血清培养基中，使得每个抗体样品有两个浓度(20nM和5nM)。

15 将3903板中的细胞液吸出50μL，每孔加入50μL的抗体和pHrodo染料混合液，每个抗体样品都设置两个复孔。并设置单加染料组和同型IgG1对照组。

培养箱培养24小时后，吸出培养基，每孔加入50μL胰酶，消化2分钟，50μL新鲜培养基终止消化。用排枪将同一样品复孔的细胞转到圆底板同一个孔中。1500rpm，离心2分钟，弃去培养液，用FACS缓冲液(PBS+2.5%FBS)洗一次细胞，1500rpm，离心2分钟。加入200μL的FACS缓冲液(PBS+2.5%FBS)，20 重悬细胞，用流式细胞仪检测FITC信号。用Flowjo 7.6分析数据。NEC49和EV201在Nectin4-CHOK1 clone3上内吞实验结果(C25-IgG1为同型IgG1阴性对照组)见表8，图5A和图5B。

表 8. 抗体的体外内吞活性

样品	20nM 抗体+60nM pHrodo	5nM 抗体+15nM pHrodo
	FITC-A 信号值	FITC-A 信号值
NEC49	1084	303
EV201	862	281
C25-IgG1	154	129
pHrodo 无抗体	160	127
培养基	11	131

25 NEC49用pHrodo的方法在Nectin4-CHOK1细胞上具有内吞活性，并且优于对照分子EV201。

测试例 5：ADC 分子细胞活性实验

本实验的目的是检测Nectin4-ADC样品对细胞杀伤作用，根据IC₅₀和最大

杀伤值来评价 Nectin4-ADC 的体外活性。

T47D（人乳腺管癌细胞，ATCC® HTB-133™）、MDA-MB-468（人乳腺癌细胞，ATCC® HTB-132™）和 MDA-MB-231（人乳腺癌细胞，ATCC® HTB-26™）细胞用胰酶消化，新鲜培养基中和，1000rpm 离心后用培养液重悬，计数后将细胞悬液密度调整为 3703 细胞/mL，以每孔 135 μL 加入到 96 孔细胞培养板 3903 中，第 11 列不铺细胞只加入 135 μL 的培养基，5%二氧化碳 37℃ 16 小时培养。

ADC-1 和 ADC-2 以样品母液浓度为首浓度，用 PBS 五倍稀释，共 8 个浓度。取出细胞培养板每孔加入 15 μL 的 10×浓度溶液。5%二氧化碳 37℃培养 6 天。

每孔加入 70 μL CTG，室温下避光孵育 10 分钟，将白色底膜贴在细胞培养板底部，置于 Victor3 上读取化学发光。本实验的数据使用了数据处理软件 GraphPad prism5.0。结果见表 9。

表 9. Nectin4-ADC 药物的细胞杀伤

样品名称	T47D (+++) IC ₅₀ (nM)	MDA-MB-468 (++) IC ₅₀ (nM)	MDA-MB-231 (-) IC ₅₀ (nM)
ADC-1	111.20	87.52	1758.00
ADC-2	192.60	151.50	967.60

注：+代表细胞上 Nectin4 的表达量，+越多代表表达量越高。

NEC49-9-A(ADC-1)在中高表达的细胞中有明显的杀伤作用，在低表达和不表达的细胞中杀伤显著降低。说明该分子比 ADC-2 具有更高的选择性。

测试例 6：ADC 分子在 T47D 小鼠移植瘤体内药效评价

将雌激素片（0.36 mg/片）皮下接种于每只 Balb/c 裸小鼠的左后背，三天后，将 0.2 mL（10×10⁶ 个）T47D 细胞（加基质胶，体积比为 1:1）皮下接种于每只小鼠的右后背，肿瘤平均体积达到约 150 mm³ 时开始分组给药，8 只/组，共 5 组。

ADC 化合物(用 PBS 配制)静脉注射，共给药 3 次，每只按体重注射 10 μL/g。空白溶剂组用 PBS 注射。

每周测量 2 次瘤体积和体重，记录数据。使用 Excel 统计软件记录数据：平均值以 avg 计算；SD 值以 STDEV 计算；SEM 值以 STDEV/SQRT（每组动物数）计算；采用 GraphPad Prism 软件作图，采用 Two-way ANOVA 或 One-way ANOVA 对数据进行统计学分析。

肿瘤体积（V）计算公式为： $V=1/2\times L_{长}\times L_{短}^2$

相对肿瘤增殖率 T/C(%)=(T-T₀)/(C-C₀)×100%，其中 T、C 为实验结束时治疗组和对照组的肿瘤体积；T₀、C₀ 为实验开始时的肿瘤体积。

抑瘤率 TGI(%)=1- T/C(%)。

结果见表 10 和图 6。

表 10. ADC 对荷瘤裸鼠 T47D 移植瘤的疗效

ADC	抑瘤率 TGI(%)	
	5mpk	2.5mpk
ADC-3	101	73
ADC-1	121	97

本实验中，受试物 ADC-3 和 ADC-1 在各剂量下对人乳腺癌 T47D 细胞小鼠移植瘤生长均有显著抑制作用，且有明显剂量依赖性。相同剂量下，ADC-1 抑制肿瘤生长的效果优于对照分子。

测试例 7：ADC 分子大鼠体内毒性实验

ADC 化合物（用生理盐水配制）尾静脉注射 SD 大鼠（雄性，浙江维通利华实验动物技术有限公司），每组 4 只，每周给药一次，共给药 3 次，每只按体重注射 5mL/kg。

实验设计：

表 11. 毒性测试给药方案

分组	ADC 化合物	给药剂量(mg/kg)
溶媒	生理盐水	0
A	ADC-3	50
B	ADC-1	50

结果表明：A 组在第一次给药后即出现动物死亡，停止摄食，体重骤减，实验即停止进行解剖，发现肾上腺肿大，肠套叠。B 组连续三次给药后动物临床观察无异常，解剖后观察无异常，各组凝血功能无异常。结果见表 12。

表 12. ADC 化合物对 SD 大鼠毒性实验结果

异常指标	血液学指标 (mean±SD)			血生化学指标 (mean±SD)		脏器系数 (%, mean±SD)	
	WBC (*10 ⁹ /L)	RET (*10 ⁹ /L)	LYM (*10 ⁹ /L)	ALT (IU/L)	TBIL (umol/L)	胸腺	肝脏
50mpk							
生理盐水	10.6±0.2	306.6±12.1	9.5±0.3	31.9±3.6	0.6±0.4	0.2±0.02	3.3±0.7
ADC-3	2.7±0.7	49.7±14.5	2.5±0.7	422.8±51.0	36.1±11.0	0.2±0.01	4.5±0.04
ADC-1	9.8±1.8	273.9±52.6	8.2±1.5	44.5±7.3	0.3±0.1	0.07±0.02	3.2±0.07

注：WBC（白细胞）、RET#（网织红细胞）、LYM（淋巴细胞）、ALT（甘氨酸氨基转移酶）、TBIL（总胆红素）

结论：

ADC-3 组在第一次给药后即出现动物死亡，多项血液和血生化指标异常。ADC-1 组在完成连续三次给药后，动物临床和解剖后观察无异常；凝血功能未表现异常；除胸腺明显缩小外其余指标无明显异常。

初步大鼠毒性实验结果提示，ADC-1 相较于对照分子有更好的体内安全性，

更低的毒副作用。

测试例 8：ADC 分子药代动力学实验

5 静脉注射 F344 RG 大鼠（雄性，北京维通达生物技术有限公司），4 只一组，共给药 1 次，每只按体重注射 5mL/kg，10mg/kg。于给药前及给药后 5 分钟，8 小时，1 天，2 天，4 天，7 天，10 天，14 天，21 天，28 天采集全血 0.2 mL，不加抗凝，取血后在 4℃放置 30 分钟，1000g 离心 15 分钟，取上清(血清)置于 EP 管中，于-80℃保存。采用 ELISA 测定血清中的抗体（总抗体）浓度和完整 ADC 浓度。结果见图 7 和表 13。

10 实验结果：

表 13. F344 RG 大鼠 PK 半衰期及主要药代动力学参数

ADC-1 10mpk	总抗体	完整 ADC
T1/2 (days)	3.5 ± 0.7	3.1 ± 0.6
AUC 0-t (µg/mL*h)	18998.27	18176.38
Cmax (µg/mL)	346.11	380.57
CL (mL/day/kg)	12.41	13.15
AUC 完整 ADC/总抗体	95.7%	

结果显示，在大鼠体内，ADC-1 有较好的血浆稳定性。

15

权利要求书:

1. 一种抗 Nectin-4 抗体, 其中所述抗 Nectin-4 抗体以小于 0.1 nM 的 EC_{50} 值与 T47D 细胞或 MDA-MB-468 细胞表达的 Nectin-4 蛋白结合, 所述的 EC_{50} 值是通过 FACS 方法测定的。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 Nectin-4 抗体, 其中所述抗 Nectin-4 抗体包含 SEQ ID NO: 6 所示的重链可变区中所包含的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 和 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区中所包含的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

10 优选的, 其中所述抗 Nectin-4 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

a. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

如上所述的 HCDR1-3 和 LCDR1-3 按 Chothia 编号规则确定; 或

15 b. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

如上所述的 HCDR1-3 和 LCDR1-3 按 IMGT 编号规则确定; 或

20 c. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

如上所述的 HCDR1-3 和 LCDR1-3 按 Kabat 编号规则确定。

3. 一种抗 Nectin-4 抗体, 其中所述抗 Nectin-4 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

a. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

如上所述的 HCDR1-3 和 LCDR1-3 按 Chothia 编号规则确定; 或

30 b. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

如上所述的 HCDR1-3 和 LCDR1-3 按 IMGT 编号规则确定; 或

35 c. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

如上所述的 HCDR1-3 和 LCDR1-3 按 Kabat 编号规则确定。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体,其中所述抗 Nectin-4 抗体是人抗体或其抗原结合片段。

5

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体, 其包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

所述重链可变区与 SEQ ID NO: 6 具有至少 90%的序列同一性, 和/或所述轻链可变区与 SEQ ID NO: 7 具有至少 90%的序列同一性;

10

优选地,

所述重链可变区如 SEQ ID NO: 6 所示; 和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 7 所示。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体, 其包含:

15

与 SEQ ID NO: 21 具有至少 85%序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 22 具有至少 85%序列同一性的轻链;

优选地, 所述的抗 Nectin-4 抗体包含:

如 SEQ ID NO: 21 所示的重链和如 SEQ ID NO: 22 所示的轻链。

20

7. 根据权利要求 3 至 6 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体,其中所述抗 Nectin-4 抗体以小于 0.1 nM 的 EC_{50} 值与 T47D 细胞或 MDA-MB-468 细胞表达的 Nectin-4 蛋白结合, 所述的 EC_{50} 值是通过 FACS 方法测定的。

25

8. 一种抗 Nectin-4 抗体, 其中所述抗体与权利要求 1 至 7 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体竞争性结合人 Nectin-4。

9. 核酸分子, 其编码权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体。

30

10. 一种宿主细胞, 其包含如权利要求 9 所述的核酸分子。

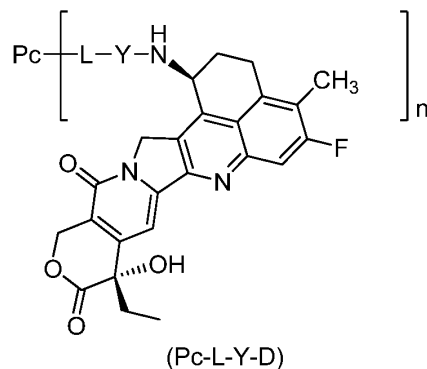
11. 一种免疫偶联物, 其包含: 权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体和效应分子, 其中, 所述效应分子偶联至所述抗 Nectin-4 抗体; 优选地, 所述效应分子选自抗肿瘤剂、免疫调节剂、生物反应修饰剂、凝集素、细胞毒性药物、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶、金属离子, 以及其任何组合。

35

12. 一种用于体内和/或体外免疫检测或测定 Nectin-4 的方法, 所述方法包括使权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体接触受试者或来自受试者的样

晶的步骤。

13. 一种通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:



5 其中:

Y 选自 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 、 $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$ 、 $-O-CR^1R^2-$ 、 $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 和 $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$;

其中, R^a 和 R^b 相同或不同, 且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、
卤代烷基、氘代烷基、烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟烷基、环烷基和杂
10 环基; 或者, R^a 和 R^b 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基;

R^1 选自卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基； R^2 选自氢原子、卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基；或者， R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

15 或者, R^a 和 R^2 与其相连的碳原子一起形成环烷基或杂环基;

m 为 0 至 4 的整数:

n 为 1 至 10;

L 为接头单元:

Pc 为如权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体。

20

14. 根据权利要求 13 所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中 n 为 1 至 8; 优选的, n 为 2 至 8。

15. 根据权利要求 13 或 14 所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物
25 或其药学上可接受的盐,

其中:

Y 为 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$;

其中，R^a和R^b相同或不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素和C₁₋₆烷基；

R¹ 为卤代 C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基;

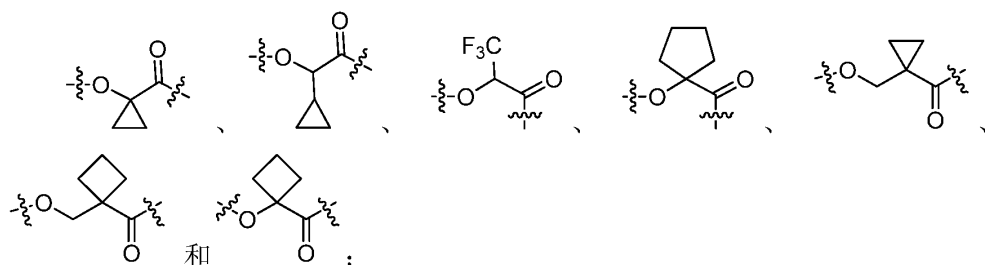
R²选自氢原子、卤代C₁₋₆烷基和C₃₋₆环烷基;

或者, R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成 C_{3-6} 环烷基;

m 为 0 或 1。

5

16. 根据权利要求 13 至 15 中任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中 Y 选自:



10 其中 Y 的 O-端与接头单元 L 相连。

17. 根据权利要求 13 至 16 中任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中接头单元-L-为-L¹-L²-L³-L⁴-,

其中, L^1 选自-(琥珀酰亚胺-3-基-*N*)-W-C(O)-、-CH₂-C(O)-NR³-W-C(O)-和
15 -C(O)-W-C(O)-, 其中 W 选自 C₁₋₆ 亚烷基和 C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基, 其中所述的
C₁₋₆ 亚烷基或 C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰
基、氨基、C₁₋₆ 烷基、卤代 C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基和 C₃₋₆ 环烷基中
的一个或多个取代基所取代;

20 L² 选自 -NR⁴(CH₂CH₂O)p¹CH₂CH₂C(O)-、-NR⁴(CH₂CH₂O)p¹CH₂C(O)-、
-S(CH₂)p¹C(O)- 和化学键，其中 p¹ 为 1 至 20 的整数；

L³ 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基，其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸、丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基，并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代；

25 L⁴选自-NR⁵(CR⁶R⁷)_t-, -C(O)NR⁵-, -C(O)NR⁵(CH₂)_t-和化学键, 其中t为1至6的整数;

R³、R⁴和R⁵相同或不同，且各自独立地选自氢原子、C₁₋₆烷基、卤代C₁₋₆烷基、氘代C₁₋₆烷基和C₁₋₆羟烷基；

30 R^6 和 R^7 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素、 C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 羟烷基。

18. 根据权利要求 13 至 17 中任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药

W 选自 C₁₋₆ 亚烷基和 C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基, 其中所述的 C₁₋₆ 亚烷基和 C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代;

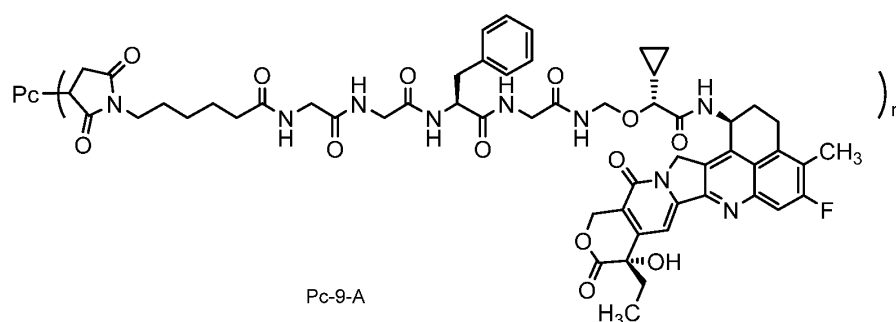
L² 选自 -NR⁴(CH₂CH₂O)p¹CH₂CH₂C(O)-、-NR⁴(CH₂CH₂O)p¹CH₂C(O)-、
5 -S(CH₂)p¹C(O)- 和化学键, 其中 p¹ 为 1 至 20 的整数;

L³ 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基, 其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸、丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基, 并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代;

10 R⁵ 选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

R⁶ 和 R⁷ 相同或不同, 且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基。

21. 根据权利要求 13 至 20 中任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 所述抗体-药物偶联物为:



其中:

n 为 1 至 8;

Pc 为抗 Nectin-4 抗体, 其包含如 SEQ ID NO: 21 所示的重链和如 SEQ ID NO:
20 22 所示的轻链。

22. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体, 或权利要求 9 所述的核酸分子, 或权利要求 13 至 21 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐; 以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀
25 释剂或载体。

23. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体, 或权利要求 9 所述的核酸分子, 或权利要求 13 至 21 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 或根据权利要求 22 所述的药物组合物在制备用于治疗 Nectin-4 介导的
30 疾病或病症的药物中的用途。

24. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体, 或权利要求 9 所述的核酸分子, 或权利要求 13 至 21 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 或根据权利要求 22 所述的药物组合物在制备用于治疗 and/或预防抗病毒、肿瘤或癌症的药物中的用途;

优选的, 所述肿瘤或癌症选自乳腺癌、胰腺癌、肺癌、食道癌、非小细胞肺癌、喉部肿瘤、咽部肿瘤、口腔肿瘤、胃癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、头颈癌、鳞状细胞癌和黑色素瘤。

25. 一种试剂盒, 其包含根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗 Nectin-4 抗体, 或权利要求 9 所述的核酸分子, 或权利要求 13 至 21 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 或根据权利要求 22 所述的药物组合物。