(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116234564 A
(43)申请公布日 2023.06.06

(21)申请号 202180062998.6

(22)申请日 2021.09.06

(66)本国优先权数据
202010972365.6 2020.09.16 CN
202011624826.7 2020.12.31 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.03.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2021/116651 2021.09.06

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/057651 ZH 2022.03.24

(71)申请人 四川科伦博泰生物医药股份有限公司
地址 611138 四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号

(72)发明人 王成 刘登念 李芬 肖亮 薛彤彤 葛均友 王晶翼 刘乐 任琦

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 杜仙 崔锡强

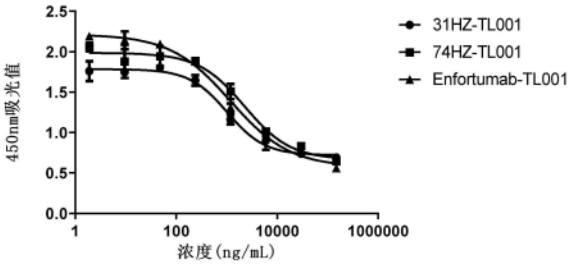
(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)

(54)发明名称

抗Nectin-4抗体、包含所述抗体的缀合物及其应用

(57)摘要

提供了抗Nectin-4抗体或其抗原结合片段、包含其的抗体缀合物以及其在制备药物中的用途,特别是在制备用于治疗和/或预防癌症的药物中的用途。



CN 116234564 A

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2022 年 3 月 24 日 (24.03.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/057651 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/116651

(22) 国际申请日: 2021 年 9 月 6 日 (06.09.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010972365.6 2020年9月16日 (16.09.2020) CN
202011624826.7 2020年12月31日 (31.12.2020) CN

(71) 申请人: 四川科伦博泰生物医药股份有限公司 (SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。

(72) 发明人: 王成(WANG, Cheng); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 刘登念(LIU, Dengnian); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 李芬(LI, Fen); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 肖亮(XIAO, Liang); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 薛彤彤(XUE, Tongtong); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 葛均友(GE, Junyou); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。 王晶翼(WANG, Jingyi); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。

(74) 代理人: 北京永新同创知识产权代理有限公司(NTD UNIVATION INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国北京市东城区北三环东路36号北京环球贸易中心C座10层, Beijing 100013 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) **Title:** ANTI-NECTIN-4 ANTIBODY, CONJUGATE INCLUDING SAME, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 抗Nectin-4抗体、包含所述抗体的缀合物及其应用

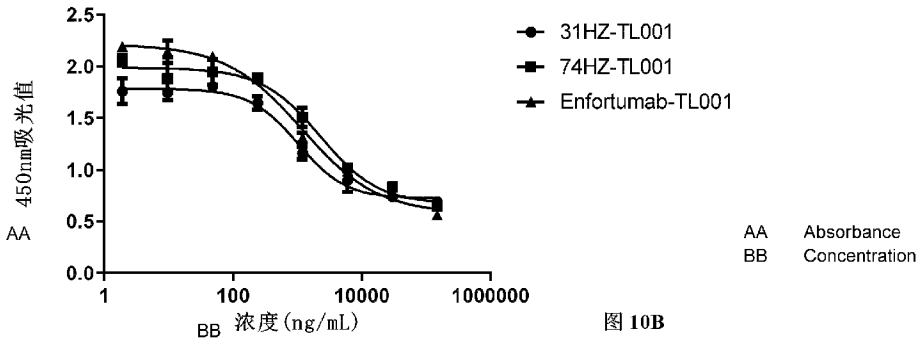


图 10B

(57) **Abstract:** Provided are an anti-Nectin-4 antibody or an antigen-binding fragment thereof, an antibody conjugate including same, and a use thereof in the preparation of a medicament, particularly in the preparation of a medicament for preventing and/or treating cancer.

(57) 摘要: 提供了抗Nectin-4抗体或其抗原结合片段、包含其的抗体缀合物以及其在制备药物中的用途，特别是在制备用于治疗和/或预防癌症的药物中的用途。

[见续页]

WO 2022/057651 A1

NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

抗 Nectin-4 抗体、包含所述抗体的缀合物及其应用

本申请要求 2020 年 9 月 16 日提交的题为“抗 Nectin-4 抗体、包含所述抗体的缀合物及其应用”的第 202010972365.6 号中国申请的优先权以及 2020 年 12 月 31 日提交的题为“抗 Nectin-4 抗体、包含所述抗体的缀合物及其应用”的第 202011624826.7 号中国申请的优先权，这些申请的全文整体援引加入本文。

技术领域

本发明属于生物医药领域。具体地，本发明涉及抗 Nectin-4 抗体与包含其的缀合物及其应用，特别是在治疗和/或预防 Nectin-4 相关疾病中的应用。

背景技术

Nectin-4 属于 Nectin 家族蛋白，又称 PVRL，属于免疫球蛋白超家族(Immunoglobulin Superfamily)，主要功能是介导钙离子非依赖型细胞粘着连接(Adhesion Junction)。Nectin 家族成员包括 Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3 及 Nectin-4，大小约 510-550 个氨基酸，属于 I 型跨膜蛋白，结构上包含由三个 Ig-like 结构域形成的胞外段加上一个跨膜区和一个胞内尾部区域。三个 Ig-like 结构域含 1 个 IgV 和两个 IgC，而其胞内区的 C-端都具有一个由 Glu/Ala-X-Tyr-Val 组成的保守区域，用于结合 Afadin 蛋白的 PDZ 结构域。Nectin-4 不具有该蛋白序列，但仍能与 Afadin 蛋白在胞内结合。

Nectin-4 可以通过抑制失巢凋亡、激活 PI3K-AKT 信号通路来促进肿瘤细胞的存活和增殖。研究表明 Nectin-4 在胃癌、肝细胞癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌和食管癌中有表达，并且在非小细胞肺癌、膀胱癌、乳腺癌和胰腺癌中有较强的表达。Nectin-4 在肿瘤中的高表达与病人预后差密切相关。因此，Nectin-4 可作为肿瘤药物开发的理想靶点。

目前靶向 Nectin-4 的 ADC 药物 Enfortumab Vedotin (参见例如 WO2012/047724)治疗尿路上皮癌适应症已经上市。Enfortumab Vedotin 是抗 Nectin-4 全人源抗体偶联 VC-MMAE 药物，DAR 值是 4。临床 III 期数据表明整体患者中 4 个人达到完全缓解(CR)，41 个人达到部分缓解(PR)，客观缓解率(ORR)为 41%；OS 中位数达到 13.6 个月，持续反应时间中位数为 5.75 个月，无进展生存期(PFS)中位数为 5.4 个月。曾经接受过免疫检查点抑制剂治疗组 89 例病人中 ORR 为 40%；未接受过免疫检查点抑制剂治疗组

23 例病人中 ORR 为 44%；肝转移组 33 例病人中 ORR 为 39%。Enfortumab Vedotin 具有优异的抗肿瘤疗效。

Nectin-4 在胎盘中表达，在部分正常组织中有弱到中度表达，如皮肤、食管、乳腺、膀胱。Enfortumab Vedotin 在临床上毒副作用主要表现为疲劳(54%)；≥3 级副作用为贫血(8%)、低钠血症(7%)、尿路感染(7%)、高血糖症(6%)；4 例患者出现与药物相关的严重副作用，包括呼吸衰竭、尿路梗阻、糖尿病酮症酸中毒和多器官衰竭等。由此表明 Enfortumab Vedotin 药物的毒副问题偏大。

发明内容

在一总的方面，本发明提供了特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段，其包含：

(1a) 如下三个根据 Chothia 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 3 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 4 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Chothia 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或者

(1b) 如下三个根据 Abm 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 9 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 10 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Abm 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或者

(1c) 如下三个根据 Kabat 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 11 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 12 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Kabat 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，
包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或

如下三个根据 Kabat 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 11 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 63 所示序列或其变体的 CDR-H2，
包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Kabat 编号系

统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(1d) 如下三个根据 IMGT 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 13 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 14 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 15 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 IMGT 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 16 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 17 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或者

(2a) 如下三个根据 Chothia 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 21 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 22 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Chothia 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或

如下三个根据 Chothia 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 18 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 22 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Chothia 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(2b) 如下三个根据 Abm 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 27 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 28 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Abm 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或

如下三个根据 Abm 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 36 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 28 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ

ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Abm 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(2c) 如下三个根据 Kabat 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 29 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 30 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Kabat 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或

如下三个根据 Kabat 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 44 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 30 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Kabat 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(2d) 如下三个根据 IMGT 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 31 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 32 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 33 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 IMGT 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 34 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 35 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或

如下三个根据 IMGT 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 54 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 32 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 33 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 IMGT 编号系统定义的轻链 CDR：包含 SEQ ID NO: 34 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 35 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(3a) 如下三个根据 Chothia 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 39 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 40 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Chothia 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或者

(3b) 如下三个根据 Abm 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 45 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 46 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Abm 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或者

(3c) 如下三个根据 Kabat 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 47 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 48 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Kabat 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或

如下三个根据 Kabat 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 47 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 64 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 Kabat 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(3d) 如下三个根据 IMGT 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 49 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 50 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 51 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或如下三个根据 IMGT 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 52 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 53 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)；优选地，所述置换是保守置换。

在优选的实施方案中，所述抗体或抗原结合片段还包含衍生自人或鼠免疫球蛋白的框架区。

在一方面，本发明提供一种抗体缀合物，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段以及至少一种治疗剂。

在又一方面，本发明提供一种嵌合抗原受体(CAR)以及表达所述 CAR 的免疫效应细胞。

在又一方面，本发明还涉及一种融合蛋白，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段，以及另外的生物活性多肽。

本发明还涉及一种药物组合物，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物、免疫效应细胞、多特异性抗体或融合蛋白，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在又一总的方面，本发明涉及本发明的抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物、免疫效应细胞、多特异性抗体、融合蛋白或药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

本发明还涉及本发明的抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物、免疫效应细胞、多特异性抗体、融合蛋白或药物组合物在治疗和/或预防癌症中的用途。

在另一总的方面，本发明还提供了一种治疗有需要的受试者中癌症的方法，所述癌症与 Nectin-4 相关。所述方法包括向所述受试者给药治疗有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物、免疫效应细胞、多特异性抗体、融合蛋白或药物组合物。

优选地，所述癌症选自胃癌、肝癌、肝细胞癌、膀胱癌、尿路上皮癌、尿道癌、肾盂癌、输尿管癌、肺癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、乳腺导管癌、三阴性乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、结肠癌、直肠癌和食管癌。

具体实施方式

定义

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文所用，“至少一个(种)”或“一个(种)或多个(种)”可以表示 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 个(种)或更多个(种)。

表述“包含”或与其同义的类似表述“包括”、“含有”和“具有”等是开放性的，不排除

额外的未列举的元素、步骤或成分。表述“由...组成”排除未指明的任何元素、步骤或成分。表述“基本上由...组成”指范围限制在指定的元素、步骤或成分，加上任选存在的不会实质上影响所要求保护的主题的基本和新的特征的元素、步骤或成分。应当理解，表述“包含”涵盖表述“基本上由...组成”和“由...组成”。

术语“任选”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可能发生或可能不发生，该描述包括发生所述事件或情况和不发生所述事件或情况。

如本文所用，“多肽”是指通过肽键连接的两个或更多个氨基酸形成的聚合物。“蛋白”可以由一条或多条多肽以共价或非共价方式形成。除非另有说明，否则术语“多肽”和“蛋白质”在本文可互换使用。

如本文所用，“抗体”指免疫球蛋白或其片段，其通过至少一个抗原结合位点特异性结合抗原表位。在本文中，抗体的定义涵盖抗原结合片段。因此，术语“抗体”包括多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人抗体、非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单域抗体以及抗原结合片段。抗体可以是合成的(例如通过化学偶联或生物偶联产生的)、酶促处理得到的或重组产生的。本文所提供的抗体包括任何免疫球蛋白类型(例如，IgG、IgM、IgD、IgE、IgA 和 IgY)、任何类别(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类(例如，IgG2a 和 IgG2b)。在一实施方案中，本发明的抗体为鼠源单克隆抗体。在又一实施方案中，本发明的抗体为人源化单克隆抗体。

如本文所用，“传统抗体”或“全长抗体”通常包含四条多肽：两条重链(HC)和两条轻链(LC)。每条轻链从 N 末端到 C 末端包含“轻链可变区(VL)”和“轻链恒定区(CL)”。每条重链从 N 末端到 C 末端包含“重链可变区(VH)”以及“重链恒定区(CH)”。重链恒定区从 N 末端到 C 末端可以包含 CH1、CH2 和 CH3。在某些免疫球蛋白类型(例如 IgM 和 IgE)中，重链恒定区还可以包含 CH4。“Fc”片段指包含 CH2 和 CH3 的片段，其提供与 Fc 受体结合的位点。“铰链区”指抗体中连接免疫球蛋白 Fab 和 Fc 片段的部分。在有些情况下，铰链区指 T 细胞受体中连接恒定区和跨膜结构域的部分。在本文中，当对于嵌合抗原受体使用时，铰链区还可以指任何功能等同物。本领域技术人员可以根据已知的算法和软件判断 VH、VL、CL、CH1、CH2、CH3 和铰链区在抗体中的位置，可以应用的算法和软件的描述可以参见例如 William R. Strohl, Lila M. Strohl, (2012), Antibody structure–function relationships, In Woodhead Publishing Series in Biomedicine, Therapeutic Antibody Engineering, Woodhead Publishing, pp. 37-56。

通常，VL 和 VH 各自可以包含三个高度可变的“互补决定区(CDR)”和四个相对保守的“框架区(FR)”，并且从 N 末端到 C 末端以 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的次序连接。在本文中，轻链可变区的 CDR (CDRL)可以称为 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3，重链可变区的 CDR (CDRH)可以称为 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3。通常认为包含一

对 VH 和 VL 的六个 CDR 决定抗原结合位点的结合特异性，但在某些情况下，包含少于六个 CDR(例如三、四或五个)的其他片段(例如单域抗体，又称为纳米抗体)同样具有结合抗原的能力。本领域技术人员可以使用本领域熟知的方法识别 CDR，例如使用 Kabat、Abm 或 Chothia 编号法。在本文中，对于同一个可变区可以使用多个 CDR 编号系统，例如 Chothia、Abm、Kabat 和 IMGT。本领域技术人员应当理解，尽管由不同编号系统定义的 CDR 可能会不同，但是同一编号系统对应的 CDR 代表能够结合抗原表位的有效抗原结合位点。有关 CDR 编号系统的描述可以参见例如，Kabat 编号系统：Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242；Chothia 编号系统：Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917；IMGT 编号系统：Lefranc, M.-P., 2011(6), IMGT, the International ImMunoGeneTics Information System Cold Spring Harb Protoc.；Abm 编号系统：Martin, A.C.R. and J. Allen (2007) “Bioinformatics tools for antibody engineering,” in S. Dübel (ed.), Handbook of Therapeutic Antibodies. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, pp. 95–118。

在本文中，术语“框架区”和“构架区”可以互换使用。如本文中所使用的，术语“框架区”、“构架区”或“FR”残基是指，抗体可变区中除了如上定义的 CDR 残基以外的那些氨基酸残基。

通常认为，由一个 VH 和一个 VL 通过非共价作用构成的“Fv”片段为包含抗原结合位点的最小的抗原结合片段。但是只包含重链可变区的单域抗体(VHH，又称 sdAb 或纳米抗体)也可以有抗原结合能力。可以通过肽接头将 VH 和 VL 连接来获得“单链 Fv (scFv)”。通过向 Fv 或 scFv 中引入二硫键可以分别获得“二硫键稳定的 Fv (dsFv)”或“单链二硫键稳定的 Fv (scdsFv 或 dsscFv)”。在一些实施方案中，例如本发明的抗体缀合物、多特异性抗体或 CAR 中的抗原结合片段优选使用 scFv 或 scdsFv。

如本文所用，“Fab”包含一个完整的抗体轻链(VL-CL)和抗体重链可变区和一个重链恒定区(VH-CH1，也称为 Fd)。用肽接头将“Fab”中的 CL 和 CH1 连接可以获得单链“Fab (scFab)”。“$F(ab')_2$”基本上包含通过铰链区的二硫键连接的两个 Fab 片段。“Fab'”为 $F(ab')_2$ 的一半，其可以通过还原 $F(ab')_2$ 铰链区的二硫键获得。

抗体或抗原结合片段可以是“单价”、“二价”、“三价”或“四价”或更多价，是指其具有多个抗原结合位点(例如 1、2、3 或 4 个或者更多个)。

当抗体或抗原结合片段所结合的抗原为两种或更多种(例如 2、3、4、5 或 6 种)时，其又可以称为“多特异性抗体”，例如双特异性抗体、三特异性抗体或四特异性抗体，其分别表示能够结合 2、3 或 4 种抗原的多特异性抗体。

如本文所用，“双抗体(diabody)”指这样的抗体，其包含两个 scFv，具有两个抗原结合位点(二价)，其中每个 scFv 中的 VH 和 VL 之间通过短肽接头(大约 5-10 个氨基酸残

基)连接，使得 VH 和 VL 链间配对(即第一 scFv 的 VH 和第二 scFv 的 VL 配对，第一 scFv 的 VL 和第二 scFv 的 VH 配对)形成抗原结合位点。双抗体可以是双特异性抗体。

如本文所用，抗体的“抗原结合片段”指全长抗体的部分，其少于全长，但是至少包含全长抗体的部分可变区(例如包含一个或多个 CDR 和/或一个或多个抗原结合位点)，并因此保留全长抗体的至少部分特异性结合抗原的能力。抗原结合片段可以例如包括通过酶促处理全长抗体所产生的抗体衍生物、合成产生的衍生物、重组产生的衍生物。抗原结合片段的实例包括但不限于 Fv、scFv、dsFv、scdsFv、Fab、scFab、Fab'、$F(ab')_2$、双抗体、Fd 和 Fd'片段以及其他片段(例如包含修饰的片段)。抗原结合片段可以包含多条肽链，例如通过二硫键和/或通过肽接头连接和/或非共价作用构成。

如本文使用，术语“单克隆抗体”是指一群高度均质的抗体，其中所包含的抗体分子之间除了可能少量存在的可能天然发生的突变之外是基本相同的。单克隆抗体通常特异性结合单一的抗原表位。可用于本发明中的单克隆抗体可以通过本领域已知的任何方法制备，例如从转基因动物中产生(例如转基因小鼠)、由永生化的 B 细胞(例如 B 细胞杂交瘤)产生，或者使用重组 DNA 方法在细菌、真核动物或植物细胞中制备，或者从噬菌体抗体文库中分离。本发明的抗体或抗原结合片段为单克隆抗体。在一实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段为人源化单克隆抗体。

“嵌合抗体”指这样的抗体，其中的一部分(例如 CDR、FR、可变区、恒定区或其组合)与衍生自特定物种的抗体中相应序列相同或同源，剩余的部分与衍生自另一物种的抗体中相应序列相同或同源。在本文中，“嵌合抗体”还涵盖包含属于不同抗体类型或亚类的部分的抗体。在一具体实施方案中，所述嵌合抗体具有鼠源抗体可变区和人源抗体恒定区。

如本文所用，“人源化抗体”指含有非人源抗体和人源抗体序列的抗体。因此，人源化抗体是含有衍生自非人免疫球蛋白最小序列的嵌合抗体。非人抗体可以是来源于任何非人物种的抗体或其中包含非人物种来源的部分的抗体(例如嵌合抗体)。非人物种例如可以包括小鼠、大鼠、兔、羊驼或非人灵长类动物。由非人抗体获得人源化抗体的技术是本领域技术人员熟知的。人源化抗体可以由非人抗体(例如鼠源抗体或嵌合抗体)产生，例如，将非人抗体(例如鼠源抗体)的 CDR 序列移植到人抗体框架区中。在某些情况下，为了保持人源化抗体的抗原结合能力和/或稳定性，可以在人抗体框架区中保留非人抗体(例如鼠源抗体)框架序列的关键氨基酸残基，即进行“回复突变”(参见，例如 Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81(21): 6851-6855; Neuberger et al. (1984) Nature 312: 604-608)。

如本文所用，氨基酸序列的“百分比(%)序列同一性”、“序列同一性”具有本领域公认的定义，其指通过序列比对(例如通过人工检视或可公知的算法)确定的两个多肽序列之

间相同的百分比。可以使用本领域技术人员已知的方法确定，例如使用可公开获得的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、Clustal Omega、FASTA 软件。

“亲和力”或“结合亲和力”用来衡量抗体和抗原之间通过非共价作用相互结合的强度。“亲和力”的大小通常可以报告为平衡解离常数 K_D 或 EC_{50}。K_D 可以通过测量平衡缔合常数(ka)和平衡解离常数(kd)来计算：$K_D = kd/ka$。可以用本领域已知的常规技术测定亲和力，例如生物膜干涉技术(可以采用例如 Octet Fortebio 检测系统)、放射免疫法、表面等离子共振法、酶联免疫测定或流式细胞术等。

在本文中，抗体和抗原“特异性结合”是指抗体和抗原之间以较高的亲和力相互结合。通常，特异性结合的两个抗体和抗原之间的 K_D 值为至少约 10^{-6} 到至少约 10^{-9} M 或更低，例如至少约 10^{-6}、至少约 10^{-7}、至少约 10^{-8}、至少约 10^{-9} M 或更低。

在本文中，“源自”或“衍生自”参考氨基酸序列的氨基酸序列与所述参考氨基酸序列部分或者全部相同或同源。例如，衍生自人免疫球蛋白的重链恒定区的氨基酸序列与其所源自的人免疫球蛋白重链恒定区的野生型序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%的序列同一性。

在本文中，多肽或氨基酸序列的“变体”与其所源自的多肽或氨基酸序列相比，具有一个或多个氨基酸突变或修饰。氨基酸突变包括氨基酸的置换、缺失或添加。本领域技术人员应当理解多肽或蛋白中非必需区中的氨基酸可以用合适的保守氨基酸置换，并且一般不改变其生物活性(参见，例如 Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224)。合适的保守置换是本领域技术人员熟知的。在下表中列出一些常见的氨基酸残基保守置换的非限制性实例。在某些情况下，氨基酸置换是非保守置换。本领域即是人员应当理解，可以对抗体或抗体片段进行氨基酸突变或修饰来改变其性能，例如改变抗体糖基化修饰的类型，改变形成链间二硫键的能力，或者为抗体缀合物的制备提供活性基团。包含这类氨基酸突变或修饰的抗体或其抗原结合片段也涵盖在本发明的抗体或其抗原结合片段的范围之内。

原始残基	示例性的保守置换	优选的置换
Ala (A)	Val，Leu，Ile	Val
Arg (R)	Lys，Gln，Asn	Lys
Asn (N)	Gln，His，Asp，Lys，Arg	Gln
Asp (D)	Glu，Asn	Glu
Cys (C)	Ser，Ala	Ser
Gln (Q)	Asn，Glu	Asn
Glu (E)	Asp，Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn，Gln，Lys，Arg	Arg

Ile (I)	Leu，Val，Met，Ala，Phe	Leu
Leu (L)	Ile，Val，Met，Ala， Phe	Ile
Lys (K)	Arg，Gln，Asn	Arg
Met (M)	Leu，Phe，Ile	Leu
Phe (F)	Trp，Leu，Val，Ile，Ala，Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val，Ser	Ser
Trp (W)	Tyr，Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp，Phe，Thr，Ser	Phe
Val (V)	Ile，Leu，Met，Phe，Ala	Leu

在本文中，术语“多核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”指包含至少两个连接的核苷酸或核苷酸衍生物的寡聚体或聚合物，通常可以包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。

如本文所用，“分离的”是指物质(例如核酸分子或多肽)与其存在的来源或环境是分离的，即基本上不包含其他任何成分。

在本文中，“载体”是用于将外源核酸导入宿主细胞的媒介，当载体转化入适当的宿主细胞时，外源核酸得以扩增或表达。载体通常保持游离，但是可以设计为使基因或其部分整合入基因组的染色体。如本文所用，载体的定义涵盖质粒、线性化质粒、病毒载体、粘粒、噬菌体载体、噬菌粒、人工染色体(例如，酵母人工染色体和哺乳动物人工染色体)等。

如本文所用，“表达载体”指能够表达 DNA 的载体，所述 DNA 与能够影响 DNA 表达的调控序列(如启动子、核糖体结合位点)可操作地连接。调控序列可以包含启动子和终止子序列，并且任选地可以包含复制起点、选择标记、增强子、多腺苷酸化信号等。表达载体可以是质粒、噬菌体载体、重组病毒或其他载体，当引入适当的宿主细胞时，导致克隆 DNA 的表达。适当的表达载体是本领域技术人员公知的，并且包含在真核细胞和/或原核细胞中可复制的表达载体以及保持游离的表达载体或者整合入宿主细胞基因组的表达载体。

如本文所用，“宿主细胞”是用于接受、保持、复制或扩增载体的细胞。宿主细胞还可以用来表达核酸或载体所编码的多肽。宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞。

如本文所用，术语“治疗”指对疾病/症状的改善，例如使疾病/症状减轻或消失、防止或减缓疾病/症状的发生、进展和/或恶化。因此，治疗包括预防、治疗和/或治愈。

“有效量”是指这样的剂量，其足以使疾病症状的严重性降低，疾病无症状期的频率和持续时间增加，或者防止因疾病痛苦而引起的损伤或失能。“有效量”指防止、治愈、改善、阻滞或部分阻滞疾病或症状所需的量。例如，对于肿瘤的治疗，相对于未接受治疗的对象，“有效量”的本发明的抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物、免疫效应细胞或药物组合物优选地将肿瘤细胞生长或肿瘤生长抑制至少约 10%，优选

至少约 20%，更优选至少约 30%，更优选至少约 40%，更优选至少约 50%，更优选至少约 60%，更优选至少约 70%，更优选至少约 80%。抑制肿瘤生长的效力可以利用本领域常规的肿瘤动物模型评估，例如自发性肿瘤、诱发性肿瘤、移植性肿瘤动物模型。或者，也可以利用本领域公知的体外检测方法检查抑制细胞生长的能力。有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物、免疫效应细胞或药物组合物能够减小肿瘤大小，或以其他方式缓解对象的症状(如预防和/或治疗转移或复发)。本领域技术人员可以根据例如对象的年龄、身体状况、性别、症状的严重程度、特定组合物或给药途径等因素来确定有效量。有效量可以在一次或多次施用中给予。

如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的(参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995)，并且包括但不限于：pH 调节剂、表面活性剂、佐剂、离子强度增强剂、稀释剂、维持渗透压的试剂、延迟吸收的试剂、防腐剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液。表面活性剂包括但不限于阳离子、阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 Tween-80。离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂，例如对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等。维持渗透压的试剂包括但不限于糖、NaCl 及其类似物。延迟吸收的试剂包括但不限于单硬脂酸盐和明胶。稀释剂包括但不限于水、水性缓冲液(如缓冲盐水)、醇和多元醇(如甘油)等。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂，例如硫柳汞、2-苯氧乙醇、对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等。稳定剂具有本领域技术人员通常理解的含义，其能够稳定药物中的活性成分的期望活性，包括但不限于谷氨酸钠、明胶、SPGA、糖类(如山梨醇、甘露醇、淀粉、蔗糖、乳糖、葡聚糖、或葡萄糖)、氨基酸(如谷氨酸、甘氨酸)、蛋白质(如干燥乳清、白蛋白或酪蛋白)或其降解产物(如乳白蛋白水解物)等。

如本文所用，哺乳动物的实例包括但不限于人、非人灵长类动物、大鼠、小鼠、牛、马、猪、羊、狗、猫等。在本文中，术语“对象”是指哺乳动物，例如人。在一些实施方案中，对象是人。在一些实施方案中，对象是癌症患者、怀疑患有癌症或处于患癌风险中的人或者动物。在本文中，术语“对象”和“受试者”可以互换使用。

抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段

在一总的方面，本发明提供了抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段，其特异性识别并结合 Nectin-4。

Nectin-4 可以为包含人 Nectin-4 或非人 Nectin-4 全长或部分氨基酸序列的蛋白。优选地，所述 Nectin-4 为人 Nectin-4。人 Nectin-4 可以例如具有 Uniprot 识别号(ID)：

Q96NY8-1 所示的氨基酸序列。非人 Nectin-4 可以例如是哺乳动物 Nectin-4，例如非人灵长类动物食蟹猴 Nectin-4，其可以具有例如 Uniprot 识别号(ID)：L0N6D9 所示的氨基酸序列。非人 Nectin-4 还可以例如是大鼠 Nectin-4，其可以具有例如 Uniprot 识别号(ID)：D3ZET1 所示的氨基酸序列。非人 Nectin-4 还可以例如是小鼠 Nectin-4，其可以具有例如 Uniprot 识别号(ID)：Q8R007 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合 Nectin-4 的 IgV 结构域。在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合人 Nectin-4 的 IgV 结构域。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合 Nectin-4 并阻断其与 Nectin-1 的相互作用。

在一些实施方案中，所述抗 Nectin-4 抗体包含重链可变区(VH)，其包含 3 个重链 CDRs (CDRH)：CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3。所述 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 选自表 1 中的 CDRH 组。

表 1 抗 Nectin-4 抗体的重链 CDR

编号 系统	组别	**CDR-H1 (SEQ ID NO:)**	**CDR-H2 (SEQ ID NO:)**	**CDR-H3 (SEQ ID NO:)**
Chothia	a/e	GYTFTDY (3)	HPSDSE (4)	WDFRIYYAMDY (5)
	b	GYSITSDY (21)	SFSGR (22)	GNYDGFDY (23)
	c	GYFNSITSDY (18)	SFSGR (22)	GNYDGFDY (23)
	d/f	GYTFINY (39)	HPSDSA (40)	WGNFYTVNAWYYFDY (41)
Abm	a/e	GYTFTDYWMN (9)	MIHPSDSETR (10)	WDFRIYYAMDY (5)
	b	GYSITSDYDWH (27)	YISFSGRTY (28)	GNYDGFDY (23)
	c	GYFNSITSDYDWH (36)	YISFSGRTY (28)	GNYDGFDY (23)
	d/f	GYTFINYWMN (45)	MIHPSDSATR (46)	WGNFYTVNAWYYFDY (41)
Kabat	a	DYWMN (11)	MIHPSDSETRLNQKFKD (12)	WDFRIYYAMDY (5)
	b	SDYDWH (29)	YISFSGRTYYNPSLKS (30)	GNYDGFDY (23)
	c	ITSDYDWH (44)	YISFSGRTYYNPSLKS (30)	GNYDGFDY (23)
	d	NYWMN (47)	MIHPSDSATRLNQKFKD (48)	WGNFYTVNAWYYFDY (41)
	e	DYWMN (11)	MIHPSDSETRLNQKFQG (63)	WDFRIYYAMDY (5)
	f	NYWMN (47)	MIHPSDSATRLNQSFQG (64)	WGNFYTVNAWYYFDY (41)

IMGT	a/e	GYTFTDYW (13)	IHPSDSET (14)	ARWDFRIYYAMDY (15)
	b	GYSITSDYD (31)	ISFSGRT (32)	ARGNYDGFDY (33)
	c	GYFNSITSDYD (54)	ISFSGRT (32)	ARGNYDGFDY (33)
	d/f	GYTFINYW (49)	IHPSDSAT (50)	ARWGNFYTVNAWYYFDY (51)

在一些实施方案中，所述抗 Nectin-4 抗体包含轻链可变区(VL)，其包含 3 个轻链 CDR (CDRL)：CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3。所述 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 选自表 2 中的 CDRL 组。

表 2 抗 Nectin-4 抗体的轻链 CDR

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

互补决定区(CDR)

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Chothia 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 3 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 4 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Chothia 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含

如下三个根据 Abm 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 9 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 10 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Abm 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Kabat 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 11 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 12 或 63 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Kabat 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 IMGT 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 13 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 14 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 15 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 IMGT 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 16 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 17 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 如下六个根据 Chothia 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 3 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 4 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或

(b) 如下六个根据 Abm 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 9 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 10 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或

(c) 如下六个根据 Kabat 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 11 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 12 或 63 所示序列或其变体的

CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或

(d) 如下六个根据 IMGT 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 13 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 14 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 15 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 16 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 17 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Chothia 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 21 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 22 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Chothia 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Abm 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 27 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 28 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Abm 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Kabat 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 29 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 30 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Kabat 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 IMGT 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 31 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 32 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 33 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合

Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 IMGT 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 34 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 35 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 如下六个根据 Chothia 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 21 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 22 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；或

(b) 如下六个根据 Abm 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 27 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 28 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；或

(c) 如下六个根据 Kabat 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 29 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 30 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；或

(d) 如下六个根据 IMGT 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 31 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 32 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 33 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 34 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 35 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Chothia 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 18 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 22 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Chothia 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Abm 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 36 所示序列或其变

体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 28 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Abm 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Kabat 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 44 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 30 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Kabat 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 IMGT 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 54 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 32 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 33 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段还包含如下三个根据 IMGT 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 34 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 35 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 如下六个根据 Chothia 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 18 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 22 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；或

(b) 如下六个根据 Abm 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 36 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 28 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；或

(c) 如下六个根据 Kabat 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 44 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 30 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 24 所示序列

或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；或

(d) 如下六个根据 IMGT 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 54 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 32 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 33 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 34 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 35 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Chothia 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 39 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 40 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Chothia 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Abm 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 45 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 46 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Abm 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Kabat 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 47 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 48 或 64 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 Kabat 编号系统定义的轻链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 IMGT 编号系统定义的重链 CDRs：包含 SEQ ID NO: 49 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 50 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 51 所示序列或其变体的 CDR-H3。在另一些具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含如下三个根据 IMGT 编号系统定义的轻链

CDRs：包含 SEQ ID NO: 52 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 53 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在一具体实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 如下六个根据 Chothia 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 39 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 40 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或

(b) 如下六个根据 Abm 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 45 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 46 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或

(c) 如下六个根据 Kabat 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 47 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 48 或 64 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或

(d) 如下六个根据 IMGT 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：包含 SEQ ID NO: 49 所示序列或其变体的 CDR-H1，包含 SEQ ID NO: 50 所示序列或其变体的 CDR-H2，包含 SEQ ID NO: 51 所示序列或其变体的 CDR-H3，包含 SEQ ID NO: 52 所示序列或其变体的 CDR-L1，包含 SEQ ID NO: 53 所示序列或其变体的 CDR-L2，包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3。

在如上所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段实施方案中，所述变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性，或者与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)；优选地，所述的置换是保守置换。

框架区(FR)

在一些实施方案中，所述 VH 还包含重链框架区(FR)。在另一些实施方案中，所述 VL 还包含轻链框架区(FR)。所述重链框架区和/或轻链框架区可以各自独立地衍生自任何物种免疫球蛋白的框架区。优选地，所述重链框架区和轻链框架区各自独

立地衍生自人或鼠免疫球蛋白的重链框架区和轻链框架区。在一实施方案中，所述重链框架区和轻链框架区各自独立地包含衍生自鼠免疫球蛋白的重链框架区和轻链框架区、人免疫球蛋白的重链框架区和轻链框架区或其组合的氨基酸序列。在一实施方案中，所述重链框架区和轻链框架区各自独立地包含衍生自人胚系抗体的重链框架区和轻链框架区的氨基酸序列。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含衍生自人免疫球蛋白的重链框架区，和/或所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含衍生自人免疫球蛋白的轻链框架区。因此，在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段是人源化的。在此类实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的重链框架区和/或轻链框架区可以包含一个或多个非人源(例如，鼠源)氨基酸残基，例如所述重链框架区和/或轻链框架区可以包含一或多个氨基酸回复突变，在这些回复突变中有相应的鼠源氨基酸残基。

在一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 1 所示序列或其变体的 VH。在又一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 2 所示序列或其变体的 VL。

在一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 1 所示序列或其变体的 VH，和具有如 SEQ ID NO: 2 所示序列或其变体的 VL。

在一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 55 所示序列或其变体的 VH。在又一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 56 所示序列或其变体的 VL。

在一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 55 所示序列或其变体的 VH，和具有如 SEQ ID NO: 56 所示序列或其变体的 VL。

在又一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 19 所示序列或其变体的 VH。在又一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 20 所示序列或其变体的 VL。

在又一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 19 所示序列或其变体的 VH，和具有如 SEQ ID NO: 20 所示序列或其变体的 VL。

在又一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：

具有如 SEQ ID NO: 57 所示序列或其变体的 VH。在又一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 58 所示序列或其变体的 VL。

在又一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 57 所示序列或其变体的 VH，和具有如 SEQ ID NO: 58 所示序列或其变体的 VL。

在另一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 37 所示序列或其变体的 VH。在又一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 38 所示序列或其变体的 VL。

在另一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 37 所示序列或其变体的 VH，和具有如 SEQ ID NO: 38 所示序列或其变体的 VL。

在另一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 59 所示序列或其变体的 VH。在又一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 60 所示序列或其变体的 VL。

在另一优选实施方案中，所述特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 59 所示序列或其变体的 VH，和具有如 SEQ ID NO: 60 所示序列或其变体的 VL。

在具体的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 具有如 SEQ ID NO: 1 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 2 所示序列或其变体的 VL；或者

(2) 具有如 SEQ ID NO: 19 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 20 所示序列或其变体的 VL；或者

(3) 具有如 SEQ ID NO: 37 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 38 所示序列或其变体的 VL；或者

(4) 具有如 SEQ ID NO: 55 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 56 所示序列或其变体的 VL；或者

(5) 具有如 SEQ ID NO: 57 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 58 所示序列或其变体的 VL；或者

(6) 具有如 SEQ ID NO: 59 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 60 所示序列或其变体的 VL。

在如上所述的实施方案中，所述变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%的序列同一性。或者，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)。优选地，所述置换是保守置换。

恒定区

在一些实施方案中，所述抗 Nectin-4 抗体进一步包含重链恒定区。在另一实施方案中，所述抗 Nectin-4 抗体进一步包含轻链恒定区。重链恒定区和轻链恒定区可以各自独立地衍生自任何物种的免疫球蛋白的重链恒定区和轻链恒定区。在优选的实施方案中，重链恒定区和轻链恒定区各自独立地衍生自鼠免疫球蛋白的重链恒定区或其变体和轻链恒定区或其变体。在更优选的实施方案中，重链恒定区和轻链恒定区各自独立地衍生自人免疫球蛋白的重链恒定区或其变体和轻链恒定区或其变体。所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如，至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)。

所述重链恒定区可以包含选自至少一部分铰链区、CH1、CH2、CH3 或其组合的氨基酸序列。在一实施方案中，所述重链恒定区包含 CH1。在一实施方案中，所述重链恒定区包含 CH1-铰链区-CH2。在一实施方案中，所述重链恒定区包含 CH1-铰链区-CH2-CH3。在一些实施方案中，重链恒定区还包含 CH4。重链恒定区可以衍生自任何亚型(例如 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM)、任何类别(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类(例如，IgG2a 和 IgG2b)的免疫球蛋白的重链恒定区或其组合。优选地，重链恒定区衍生自 IgG(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)重链恒定区。在一优选实施方案中，所述重链恒定区衍生自人 IgG1 重链恒定区。

所述轻链恒定区可以衍生自 λ (Lambda)轻链或 κ (Kappa)轻链恒定区。在一优选实施方案中，所述轻链恒定区为人 κ 轻链恒定区。

在一具体实施方案中，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 61 的序列或其变体。在一具体实施方案中，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 62 的序列或其变体。在这些实施方案中，所述变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%的序列同一性。或者，所述变体与其所源自的序列相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换(例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的保守置换)。

在一具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，其中：

(a) 所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 1 所示序列或其变体的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列或其变体的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 2 所示序列或其变体的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列或其变体的轻链恒定区；或者

(b) 所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 19 所示序列或其变体的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列或其变体的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 20 所示序列或其变体的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列或其变体的轻链恒定区；或者

(c) 所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 37 所示序列或其变体的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列或其变体的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 38 所示序列或其变体的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列或其变体的轻链恒定区；或者

(d) 所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 55 所示序列或其变体的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列或其变体的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 56 所示序列或其变体的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列或其变体的轻链恒定区；或者

(e) 所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 57 所示序列或其变体的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列或其变体的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 58 所示序列或其变体的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列或其变体的轻链恒定区；或者

(f) 所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 59 所示序列或其变体的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列或其变体的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 60 所示序列或其变体的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列或其变体的轻链恒定区。

在一实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段选自 scFv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv 片段、二硫键稳定的 Fv (dsFv)、双抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

鼠源抗体

在一实施方案中，本发明的抗 Nectin-4 抗体为鼠源抗体，其包含 VH 和 VL，所述 VH 包含以上所述的重链 CDR 和重链框架区，所述 VL 包含以上所述的轻链 CDR 和轻链框架区，其中所述重链框架区和轻链框架区各自独立地包含衍生自鼠免疫球蛋白框架区的氨基酸序列。在一实施方案中，本发明的抗 Nectin-4 抗体是从小鼠杂交瘤细胞产生的单克隆抗体。

在一具体实施方案中，鼠源抗体包含 VH，其包含表 1 中组 a 所述的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3 以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自鼠免疫球蛋白框架区的氨基酸序列。在一优选实施方案中，鼠源抗体包含具有如 SEQ ID NO: 1 所示序列

或其变体的 VH。在又一具体实施方案中，鼠源抗体还包含 VL，其包含表 2 中组 a 所述的 CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自鼠免疫球蛋白框架区的氨基酸序列。在一优选实施方案中，鼠源抗体包含具有如 SEQ ID NO: 2 所示序列或其变体的 VL。

在另一具体实施方案中，鼠源抗体包含 VH，其包含表 1 中组 b 所述的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3 以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自鼠免疫球蛋白框架区的氨基酸序列。在一优选实施方案中，鼠源抗体包含具有如 SEQ ID NO: 19 所示序列或其变体的 VH。在又一具体实施方案中，鼠源抗体还包含 VL，其包含表 2 中组 b 所述的 CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自鼠免疫球蛋白框架区的氨基酸序列。在一优选实施方案中，鼠源抗体包含具有如 SEQ ID NO: 20 所示序列或其变体的 VL。

在又一具体实施方案中，鼠源抗体包含 VH，其包含表 1 中组 c 所述的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3 以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自鼠免疫球蛋白框架区的氨基酸序列。在一优选实施方案中，鼠源抗体包含具有如 SEQ ID NO: 37 所示序列或其变体的 VH。在又一具体实施方案中，鼠源抗体还包含 VL，其包含表 2 中组 c 所述的 CDRL1、CDR-L2、CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自鼠免疫球蛋白框架区的氨基酸序列。在一优选实施方案中，鼠源抗体包含具有如 SEQ ID NO: 38 所示序列或其变体的 VL。

在如上所述的实施方案中，所述变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%的序列同一性。或者，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)。优选地，所述置换是保守置换。

在一具体实施方案中，鼠源抗体包含具有如 SEQ ID NO: 1 所示序列的 VH 以及具有如 SEQ ID NO: 2 所示序列的 VL。

在另一具体实施方案中，鼠源抗体包含具有如 SEQ ID NO: 19 所示序列的 VH 以及具有如 SEQ ID NO: 20 所示序列的 VL。

在又一具体实施方案中，鼠源抗体包含具有如 SEQ ID NO: 37 所示序列的 VH 以及具有如 SEQ ID NO: 38 所示序列的 VL。

嵌合抗体

在一实施方案中，本发明的抗 Nectin-4 抗体为嵌合抗体。在一些实施方案中，所述嵌合抗体包含以上所述鼠源抗体的重链 CDR 和/或轻链 CDR。在一些实施方案中，

所述嵌合抗体包含以上所述鼠源抗体的重链可变区和/或轻链可变区。在一些实施方案中，所述嵌合抗体包含以上所述鼠源抗体的重链可变区和轻链可变区，以及重链恒定区和/或轻链恒定区，所述重链恒定区衍生自非鼠源免疫球蛋白的重链恒定区，和/或所述轻链恒定区衍生自非鼠源免疫球蛋白的轻链恒定区。在一优选实施方案中，所述重链恒定区衍生人免疫球蛋白的重链恒定区，和/或所述轻链恒定区衍生自人免疫球蛋白的轻链恒定区。在一优选实施方案中，所述重链恒定区衍生自人免疫球蛋白的重链恒定区，所述轻链恒定区衍生自人免疫球蛋白的轻链恒定区。

在一些实施方案中，嵌合抗体包含表 1 中组 a 所述鼠源抗体的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3。在一些实施方案中，嵌合抗体还包含表 2 中组 a 所述鼠源抗体的 CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3。

在一具体实施方案中，嵌合抗体包含具有如 SEQ ID NO: 1 所示序列或其变体的 VH。在一具体实施方案中，嵌合抗体还包含具有如 SEQ ID NO: 2 所示序列或其变体的 VL。

在另一具体实施方案中，嵌合抗体包含具有如 SEQ ID NO: 19 所示序列或其变体的 VH。在一具体实施方案中，嵌合抗体还包含具有如 SEQ ID NO: 20 所示序列或其变体的 VL。

在又一具体实施方案中，嵌合抗体包含具有如 SEQ ID NO: 37 所示序列或其变体的 VH。在一具体实施方案中，嵌合抗体还包含具有如 SEQ ID NO: 38 所示序列或其变体的 VL。

在如上所述的实施方案中，所述变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%的序列同一性。或者，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)。优选地，所述置换是保守置换。

在一些实施方案中，如上所述的嵌合抗体还包含重链恒定区和/或轻链恒定区。在一优选实施方案中，所述重链恒定区衍生自人免疫球蛋白的重链恒定区，所述轻链恒定区衍生自人免疫球蛋白的轻链恒定区。在一实施方案中，所述重链恒定区衍生自人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区。在一实施方案中，所述重链恒定区衍生自人 IgG1 重链恒定区。在一实施方案中，所述轻链恒定区衍生自人 λ 或 κ 轻链恒定区。在一实施方案中，所述轻链恒定区衍生自人 κ 轻链恒定区。在一具体实施方案中，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列或其变体。在一具体实施方案中，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 62 的氨基酸序列或其变体。在这些实施方案中，所述变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、

至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或100%的序列同一性。或者，所述变体与其所源自的序列相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换(例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的保守置换)。

在一具体实施方案中，嵌合抗体包含重链和轻链，所述重链包含：具有如 SEQ ID NO: 1 所示序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 61 所示序列的重链恒定区，所述轻链包含：具有如 SEQ ID NO: 2 所示序列的 VL 和具有如 SEQ ID NO: 62 所示序列的轻链恒定区。

在另一具体实施方案中，嵌合抗体包含重链和轻链，所述重链包含：具有如 SEQ ID NO: 19 所示序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 61 所示序列的重链恒定区，所述轻链包含：具有如 SEQ ID NO: 20 所示序列的 VL 和具有如 SEQ ID NO: 62 所示序列的轻链恒定区。

在又一具体实施方案中，嵌合抗体包含重链和轻链，所述重链包含：具有如 SEQ ID NO: 37 所示序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 61 所示序列的重链恒定区，所述轻链包含：具有如 SEQ ID NO: 38 所示序列的 VL 和具有如 SEQ ID NO: 62 所示序列的轻链恒定区。

人源化抗体

在一实施方案中，本发明的抗 Nectin-4 抗体为人源化抗体，其包含 VH 和 VL，所述 VH 包含以上所述的重链 CDR 和重链框架区，所述 VL 包含以上所述的轻链 CDR 和轻链框架区，其中所述重链框架区和轻链框架区各自独立地包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区和轻链框架区的氨基酸序列。在此类实施方案中，所述重链框架区和/或轻链框架区可以包含一个或多个非人源(例如，鼠源)氨基酸残基，例如所述重链框架区和/或轻链框架区可以包含一或多个氨基酸回复突变，在这些回复突变中有相应的鼠源氨基酸残基。人源化抗体可以由非人抗体(例如鼠源抗体或嵌合抗体)产生。在一实施方案中，人源化抗体如本发明实施例所述由本发明的抗 Nectin-4 鼠源抗体制备。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含如上所述鼠源抗体的 CDR-H1 或其变体、CDR-H2 或其变体、CDR-H3 或其变体。在一具体实施方案中，人源化抗体还包含如上所述鼠源抗体的 CDR-L1 或其变体、CDR-L2 或其变体、CDR-L3 或其变体。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含 VH，其包含如上所述鼠源抗体的 CDR-H1 或其变体、CDR-H2 或其变体、CDR-H3 或其变体，以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区的氨基酸序列。在又一具体实施方案中，人源化抗体还包含 VL，其包含如上所述鼠源抗体的 CDR-L1 或其变体、CDR-L2 或其变体、

CDR-L3 或其变体以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自人免疫球蛋白轻链框架区的氨基酸序列。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含 VH，根据 Chothia 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 3 所示的 CDR-H1、如 SEQ ID NO: 4 所示的 CDR-H2、如 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR-H3，以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区的氨基酸序列。在又一具体实施方案中，人源化抗体还包含 VL，根据 Chothia 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR-L1、如 SEQ ID NO: 7 所示的 CDR-L2、如 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自人免疫球蛋白轻链框架区的氨基酸序列。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含 VH，根据 Abm 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 9 所示的 CDR-H1、如 SEQ ID NO: 10 所示的 CDR-H2、如 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR-H3，以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区的氨基酸序列。在又一具体实施方案中，人源化抗体还包含 VL，根据 Abm 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR-L1、如 SEQ ID NO: 7 所示的 CDR-L2、如 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自人免疫球蛋白轻链框架区的氨基酸序列。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含 VH，根据 Kabat 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 11 所示的 CDR-H1、如 SEQ ID NO: 12 或 63 所示的 CDR-H2、如 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR-H3，以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区的氨基酸序列。在又一具体实施方案中，人源化抗体还包含 VL，根据 Kabat 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR-L1、如 SEQ ID NO: 7 所示的 CDR-L2、如 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自人免疫球蛋白轻链框架区的氨基酸序列。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含 VH，根据 IMGT 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR-H1、如 SEQ ID NO: 14 所示的 CDR-H2、如 SEQ ID NO: 15 所示的 CDR-H3，以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区的氨基酸序列。在又一具体实施方案中，人源化抗体还包含 VL，根据 IMGT 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 16 所示的 CDR-L1、如 SEQ ID NO: 17 所示的 CDR-L2、如 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自人免疫球蛋白轻链框架区的氨基酸序列。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含具有如 SEQ ID NO: 56 所示序列或其变体的 VL。在一实施方案中，人源化抗体包含具有如 SEQ ID NO: 55 所示序列或其变体的 VH。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含 VH，根据 Chothia 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 21 或 18 所示的 CDR-H1、如 SEQ ID NO: 22 所示的 CDR-H2、如 SEQ ID NO: 23 所示的 CDR-H3，以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区的氨基酸序列。在又一具体实施方案中，人源化抗体还包含 VL，根据 Chothia 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 24 所示的 CDR-L1、如 SEQ ID NO: 25 所示的 CDR-L2、如 SEQ ID NO: 26 所示的 CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自人免疫球蛋白轻链框架区的氨基酸序列。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含 VH，根据 Abm 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 27 或 36 所示的 CDR-H1、如 SEQ ID NO: 28 所示的 CDR-H2、如 SEQ ID NO: 23 所示的 CDR-H3，以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区的氨基酸序列。在又一具体实施方案中，人源化抗体还包含 VL，根据 Abm 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 24 所示的 CDR-L1、如 SEQ ID NO: 25 所示的 CDR-L2、如 SEQ ID NO: 26 所示的 CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自人免疫球蛋白轻链框架区的氨基酸序列。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含 VH，根据 Kabat 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 29 或 44 所示的 CDR-H1、如 SEQ ID NO: 30 所示的 CDR-H2、如 SEQ ID NO: 23 所示的 CDR-H3，以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区的氨基酸序列。在又一具体实施方案中，人源化抗体还包含 VL，根据 Kabat 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 24 所示的 CDR-L1、如 SEQ ID NO: 25 所示的 CDR-L2、如 SEQ ID NO: 26 所示的 CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自人免疫球蛋白轻链框架区的氨基酸序列。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含 VH，根据 IMGT 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 31 或 54 所示的 CDR-H1、如 SEQ ID NO: 32 所示的 CDR-H2、如 SEQ ID NO: 33 所示的 CDR-H3，以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区的氨基酸序列。在又一具体实施方案中，人源化抗体还包含 VL，根据 IMGT 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 34 所示的 CDR-L1、如 SEQ ID NO: 35 所示的 CDR-L2、如 SEQ ID NO: 26 所示的 CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自人免疫球蛋白轻链框架区的氨基酸序列。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含具有如 SEQ ID NO: 58 所示序列或其变体的 VL。在一实施方案中，人源化抗体包含具有如 SEQ ID NO: 57 所示序列或其变体的 VH。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含 VH，根据 Chothia 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 39 所示的 CDR-H1、如 SEQ ID NO: 40 所示的 CDR-H2、如 SEQ ID NO:

41 所示的 CDR-H3，以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区的氨基酸序列。在又一具体实施方案中，人源化抗体还包含 VL，根据 Chothia 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 42 所示的 CDR-L1、如 SEQ ID NO: 43 所示的 CDR-L2、如 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自人免疫球蛋白轻链框架区的氨基酸序列。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含 VH，根据 Abm 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 45 所示的 CDR-H1、如 SEQ ID NO: 46 所示的 CDR-H2、如 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR-H3，以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区的氨基酸序列。在又一具体实施方案中，人源化抗体还包含 VL，根据 Abm 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 42 所示的 CDR-L1、如 SEQ ID NO: 43 所示的 CDR-L2、如 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自人免疫球蛋白轻链框架区的氨基酸序列。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含 VH，根据 Kabat 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 47 所示的 CDR-H1、如 SEQ ID NO: 48 或 64 所示的 CDR-H2、如 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR-H3，以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区的氨基酸序列。在又一具体实施方案中，人源化抗体还包含 VL，根据 Kabat 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 42 所示的 CDR-L1、如 SEQ ID NO: 43 所示的 CDR-L2、如 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自人免疫球蛋白轻链框架区的氨基酸序列。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含 VH，根据 IMGT 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 49 所示的 CDR-H1、如 SEQ ID NO: 50 所示的 CDR-H2、如 SEQ ID NO: 51 所示的 CDR-H3，以及重链框架区，所述重链框架区包含衍生自人免疫球蛋白重链框架区的氨基酸序列。在又一具体实施方案中，人源化抗体还包含 VL，根据 IMGT 编号系统定义，其包含如 SEQ ID NO: 52 所示的 CDR-L1、如 SEQ ID NO: 53 所示的 CDR-L2、如 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR-L3 以及轻链框架区，所述轻链框架区包含衍生自人免疫球蛋白轻链框架区的氨基酸序列。

在一实施方案中，人源化抗体包含具有如 SEQ ID NO: 60 所示序列或其变体的 VL。在一实施方案中，人源化抗体包含具有如 SEQ ID NO: 59 所示序列或其变体的 VH。

在如上所述的实施方案中，所述变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%的序列同一性。或者，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个，2 个，

3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)。优选地，所述置换是保守置换。

在某些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)，其中，所述重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)与前述人源化抗体中所述的重链可变区和/或轻链可变区相比，至少一个 CDR 和/或框架区含有氨基酸突变，所述氨基酸突变为一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合(例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合)。优选地，所述置换为保守置换。

在一些实施方案中，抗 Nectin-4 人源化抗体还包含重链恒定区。在一实施方案中，所述重链恒定区衍生自人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区。在一实施方案中，所述重链恒定区衍生自人 IgG1 重链恒定区。在一实施方案中，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列或其变体。

在一些实施方案中，抗 Nectin-4 人源化抗体还包含轻链恒定区。在一实施方案中，所述轻链恒定区衍生自人 λ 或 κ 轻链恒定区。在一实施方案中，所述轻链恒定区衍生自人 κ 轻链恒定区。在一实施方案中，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 62 的氨基酸序列或其变体。

在如上所述的实施方案中，所述变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%的序列同一性。或者，所述变体与其所源自的序列相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换(例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的保守置换)。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含重链和轻链，所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 55 所示序列的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 56 所示序列的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列的轻链恒定区。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含重链和轻链，所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 57 所示序列的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 58 所示序列的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列的轻链恒定区。

在一具体实施方案中，人源化抗体包含重链和轻链，所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 59 所示序列的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 60 所示序列的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列的轻链恒定区。

可以使用本领域已知的方法制备和生产本发明的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段。这类方法可以包括例如，从噬菌体展示文库、酵母展示文库、永生化的 B 细胞(例如，

小鼠 B 细胞杂交瘤细胞或 EBV 永生化的 B 细胞)制备和分离抗体或抗原结合片段。还可以用免疫动物的方法，例如用抗原或编码抗原的 DNA 免疫动物(例如小鼠)，从免疫后的动物分离表达抗体的 B 细胞。优选地，将表达抗体的 B 细胞永生化，例如制备成杂交瘤或 EBV 永生化的 B 细胞。还可以用编码本发明的抗体或其抗原结合片段的核酸分子或表达载体转化宿主细胞，然后从宿主细胞中表达本发明的抗 Nectin-4 或其抗原结合片段。在一些实施方案中，本发明的抗 Nectin-4 抗体由免疫后的动物中获得，例如由用人 Nectin-4 蛋白免疫的小鼠中获得。

多特异性抗体

在一方面，本发明提供了一种多特异性抗体，其包含本发明的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段以及至少一种其他抗体或其抗原结合片段或者抗体类似物，使得所述多特异性抗体能够结合 Nectin-4 以及至少一种其他抗原。

在一实施方案中，所述多特异性抗体为双特异性抗体、三特异性抗体或四特异性抗体。在一实施方案中，多特异性抗体为双特异性双抗体，其包含第一 scFv(或 scdsFv)和第二 scFv(或 scdsFv)，其中第一 scFv(或 scdsFv)包含通过短肽接头连接的本发明的 VH 和其他抗体的 VL，第二 scFv(或 scdsFv)包含通过短肽接头连接的本发明的 VL 和所述其他抗体的 VH，所述其他抗体结合 Nectin-4 以外的抗原，所述短肽接头包含 5-10 个氨基酸残基。

在一实施方案中，其他抗原为细胞表面蛋白、受体或受体亚基。细胞表面蛋白可以例如是免疫细胞受体。免疫细胞可以例如是免疫效应细胞，例如自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤 T(NKT)细胞、细胞毒性 T(CTL)细胞。在一优选实施方案中，双特异性抗体可以同时结合 Nectin-4 和 PD-1。

多特异性抗体为多价抗体，例如可以为二价、三价、四价或更多价。

在一优选实施方案中，多特异性抗体包含的抗原结合片段选自 scFv、dsFv、scdsFv、Fab、scFab、Fab'、$F(ab')_2$。

多特异性抗体还可以包含抗体重链恒定区和/或轻链恒定区。重链恒定区可以包含选自至少一部分铰链区、CH1、CH2、CH3 或其组合的氨基酸序列。优选地，所述重链恒定区具有 CH1。

利用感兴趣的抗体或抗体片段构建多特异性抗体的方法是本领域技术人员熟知的(参见，例如国际专利申请公布号 WO 93/08829；Suresh et al., (1986) Methods in Enzymology, 121: 210；Traunecker et al., (1991) EMBO, 10: 3655-3659)。

可以利用本领域已知的各种技术产生和分离多特异性抗体。例如，可以用重组 DNA 技术获得编码多特异性抗体的核酸分子，任选地将所述核酸分子克隆入表达载体，然后

用所述核酸分子或表达载体转化宿主细胞，在合适的条件下培养转化的宿主细胞以允许所述核酸或表达载体表达，最后从宿主细胞或培养基中分离和纯化多特异性抗体。

融合蛋白

在又一方面，本发明提供了一种融合蛋白，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段，以及另外的生物活性多肽。

在优选的实施方案中，所述另外的生物活性多肽是具有治疗活性、结合活性或酶活性的多肽或蛋白。生物活性多肽的非限制性实例可以包括但不限于：蛋白毒素(例如白喉毒素、蓖麻毒素)、酶(例如脲酶、辣根过氧化物酶)、细胞因子。

核酸、载体和宿主细胞

在另一方面，本发明提供了一种核酸分子，其包含编码本发明的抗 Nectin-4 抗体或抗原结合片段的多核苷酸序列。可以利用本领域已知的方法获得所述核酸，例如，分离自噬菌体展示文库、酵母展示文库、免疫动物、永生化的细胞(例如，小鼠 B 细胞杂交瘤细胞、EBV 介导的永生化 B 细胞)或者化学合成。本发明的核酸分子可以针对用于表达的宿主细胞进行密码子优化。所述核酸分子可以是分离的。

在又一方面，本发明还提供了包含所述核酸分子的载体。在一实施方案中，本发明的核酸分子制备为重组核酸。在一实施方案中，将本发明的核酸分子克隆入表达载体中。表达载体可以进一步包含额外的多核苷酸序列，例如调控序列和抗生素抗性基因。可使用本领域众所周知的技术制备包含本发明的核酸的所述重组核酸，例如化学合成、DNA 重组技术(例如聚合酶链式反应(PCR)技术)等(参见 Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)。表达载体还可以包含编码多肽或蛋白的多核苷酸序列，所述多肽或蛋白可促进所表达抗体或抗原结合片段的检测和/或分离。这类多肽或蛋白可以包括但不限于亲和标签(例如生物素、聚组氨酸标签(His_6)或谷胱甘肽 S-转移酶(GSH)标签)、包含蛋白酶切割位点的多肽和报告蛋白(例如荧光蛋白)。本发明的核酸分子可以存在于一种或多种载体中。在一些实施方案中，所述表达载体为 DNA 质粒，例如用于在细菌、酵母或哺乳动物细胞中表达的 DNA 质粒。在另一些实施方案中，所述表达载体为病毒载体。在其他实施方案中，表达载体为噬菌体载体或噬菌粒载体。

本发明还提供了一种宿主细胞，其包含至少一个如上所述的核酸或载体。在优选的实施方案中，本文的宿主细胞用于表达本发明的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段。宿主细胞的实例包括但不限于原核细胞(例如细菌，例如大肠杆菌)、真核细胞(例如酵母、昆虫细胞、哺乳动物细胞)。

细菌(例如，大肠杆菌 BL21(DE3))对于表达较小的抗原结合片段，例如 Fv，scFv，Fab 和 Fab'片段特别有利。在一些实施方案中，将编码重链可变区和轻链可变区的核酸分子克隆到单个载体中并导入 BL21(DE3)。适合于抗体表达的哺乳动物宿主细胞包括但不限于骨髓瘤细胞、HeLa 细胞、HEK 细胞(例如 HEK 293 细胞)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和其他适于表达抗体的哺乳动物细胞。

本发明还提供了一种在宿主细胞中产生本发明的抗 Nectin-4 抗体或抗原结合片段的方法，其中所述方法包括以下步骤：

(I) 用至少一种本文所述的核酸或表达载体转化宿主细胞，

(II) 在合适的条件下培养转化的宿主细胞以允许所述核酸或表达载体表达，和

(III) 从宿主细胞或培养基中分离和纯化本发明的抗体或抗原结合片段。

在一些实施方案中，使用单一的载体，其包含编码重链和轻链的多核苷酸序列。在一些实施方案中，使用两种载体，其中一种载体编码抗体的轻链，而另一种编码抗体的重链。在一些实施方案中，宿主细胞还包含伴侣质粒，其可以帮助提高抗体或抗体片段的溶解性、稳定性和/或折叠。从宿主细胞中分离和纯化抗体的技术是本领域技术人员所熟知的。

抗体缀合物

本发明还提供了一种抗体缀合物，其包含与至少一种治疗剂缀合的本发明的抗体或其抗原结合片段。抗体药物缀合物(ADC)是一种典型的抗体缀合物，其中所述治疗剂可以例如为细胞毒性剂。

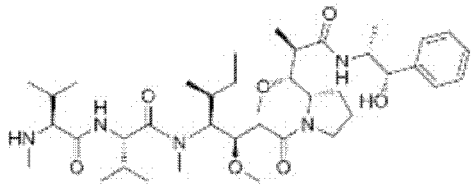
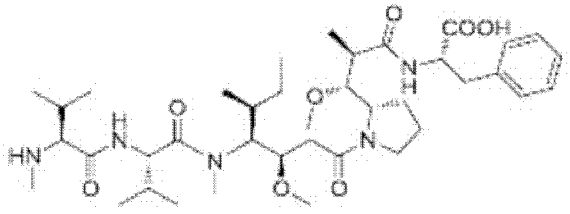
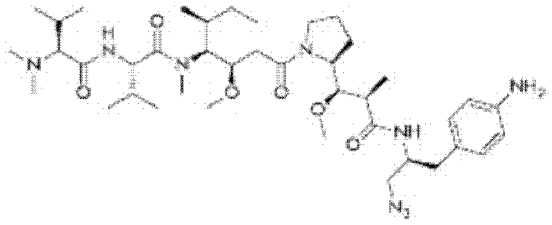
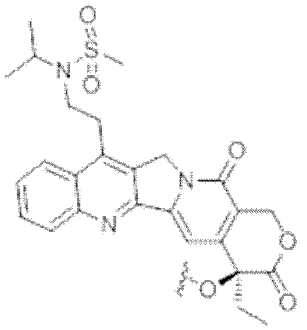
在一些优选的实施方案中，本发明的抗体缀合物能够靶向Nectin-4阳性的靶细胞并追踪或杀死靶细胞。在一些更优选的实施方案中，本发明的抗体缀合物选择性地杀死Nectin-4阳性癌细胞。在一些实施方案中，所述癌细胞选自胃癌细胞、乳腺癌细胞、膀胱癌细胞、肺癌细胞、肝癌细胞、结肠癌细胞、直肠癌细胞、头颈癌细胞和卵巢癌细胞。

治疗剂可以选自细胞毒性剂、治疗性抗体(例如与另外的抗原特异性结合的抗体或其抗原结合片段)、放射性同位素、寡核苷酸及其类似物(例如干扰 RNA)、生物活性肽、蛋白毒素(例如白喉毒素、蓖麻毒素)和酶(例如脲酶)。细胞毒性剂是指抑制或降低细胞的活性、功能和/或杀死细胞的物质。细胞毒性剂的实例可以包括但不限于：类美登素(maytansinoid)(例如美登素(maytansine)、奥利斯他汀类(例如 MMAF、MMAE、MMAD)、多司他汀(duostatin)、念珠藻环肽(cryptophycin)、长春花生物碱类(例如长春碱、长春新碱)、秋水仙碱类、海兔毒素类、紫杉烷、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、烯二炔类抗生素、细胞松弛素类、喜树碱类、蒽环类抗生素(例如道诺霉素(daunorubicin)、二羟基蒽二酮(dihydroxyanthracindione)、多柔比星(doxorubicin))、细胞毒性抗生素(例如丝裂霉素

(mitomycin)、放线菌素(actinomycin)、倍癌霉素(duocarmycin)(例如 CC-1065)、金霉素(auromycin)、多霉素(duomycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、内孢霉素(endomycin)、酚霉素(phenomycin))、阿霉素、柔红霉素、卡奇霉素、顺铂(cisplatin)、溴化乙锭(ethidiumbromide)、博来霉素、丝裂霉素、光辉霉素、普拉地内酯、鬼臼毒素、依托泊苷(etoposide)、米托蒽醌、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、巯嘌呤、喷司他丁、氟达拉滨、克拉屈滨、奈拉滨、卡莫司汀、洛莫司汀、甲氨蝶呤、苯丙氨酸氮芥、替尼泊苷(tenoposide)、糖皮质激素等。

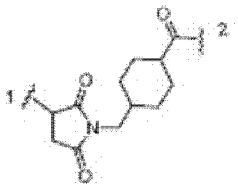
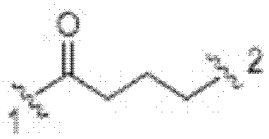
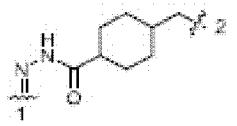
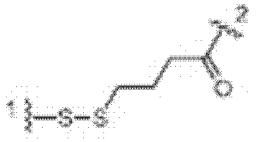
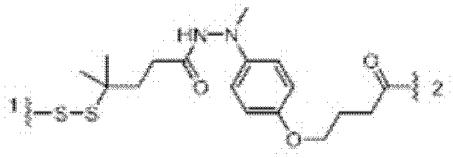
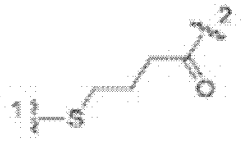
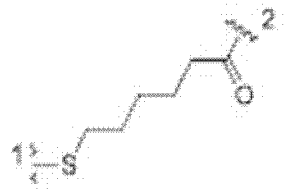
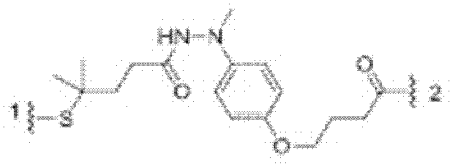
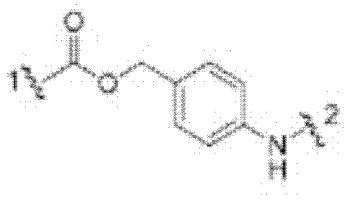
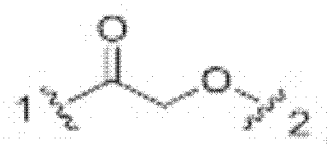
放射性同位素可以选自例如^{212}Bi、^{213}Bi、^{131}I、^{125}I、^{111}In、^{177}Lu、^{186}Re、^{188}Re、^{153}Sm、^{90}Y。用放射性同位素标记的抗体又可称为放射免疫缀合物。

在一实施方案中，治疗剂为具有抗肿瘤生物活性的分子。具有抗肿瘤生物活性的分子包括但不限于细胞毒性剂、化疗剂、放射性同位素、免疫检查点抑制剂、靶向肿瘤特异性抗原的抗体和其他抗肿瘤药物。在优选一实施方案中，治疗剂为细胞毒性剂。在又一优选实施方案中，治疗剂为放射性同位素。

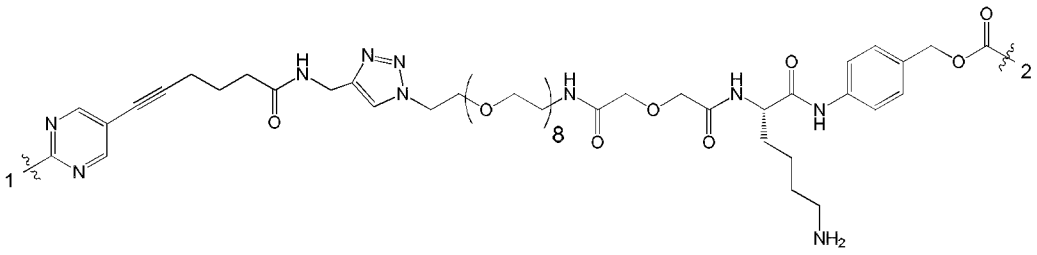
在一具体实施方案中，治疗剂为 、、、或 。

可以利用本领域已知的任何技术将治疗剂与本发明的抗体或抗原结合片段通过接头缀合。所述接头可以包含用于共价缀合的活性基团，例如胺、羟胺、马来酰亚胺基、羧基、苯基、硫醇、巯基或羟基。接头可为可切割的或不可切割的。可切割的接头例如酶可切割的接头(例如，包含蛋白酶切割位点的肽)、pH敏感的接头(例如，腙类接头)或可还原的接头(例如，二硫键)。

在一实施方案中，接头包含选自胺、羟胺、马来酰亚胺基、羧基、苯基、硫醇、巯基和羟基的活性基团。在一实施方案中，接头为化学键。在一实施方案中，接头包含氨基酸或 2-10 个氨基酸组成的肽。氨基酸可以是天然或非天然氨基酸。

在一优选实施方案中，接头选自 Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn 、、、、、、、、、、

或



；其中 1 和 2 中的一个表示接头与本发明的抗体或其抗原结合片段连接的位置，另一个表示接头与治疗剂连接的位置。

在一些实施方案中，在与本发明的抗体或抗原结合片段缀合之前，先将治疗剂和接头缀合形成中间体。在一些实施方案中，中间体通过与本发明的抗体或抗原结合片段上的巯基形成硫醚键而连接。这类中间体的结构和制备方法以及使用其制备抗体缀合物的方法描述于例如国际专利申请公布号WO2019/114666，其相关内容整体援引加入本文。

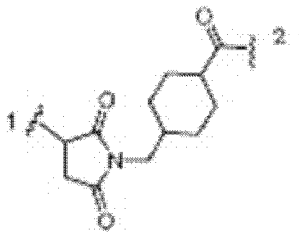
在一实施方案中，所述抗体缀合物具有式(I)所示结构，

$$A\text{-}(L\text{-}D)_{\gamma}$$

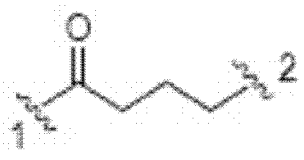
(I)；

其中，A 为本发明的抗体或其抗原结合片段；

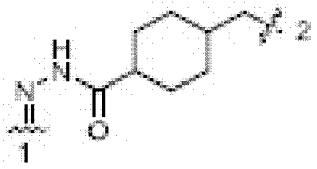
L 为接头；优选地，L 包含氨基酸或 2-10 个氨基酸组成的肽；进一步优选地，



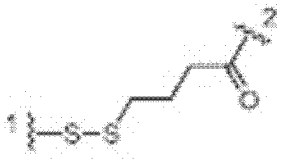
L 选自 Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、



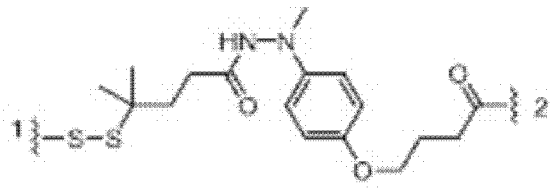
、



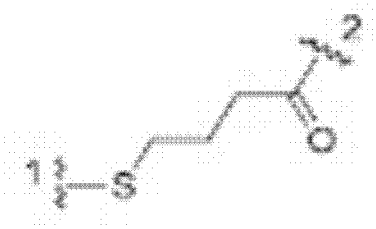
、



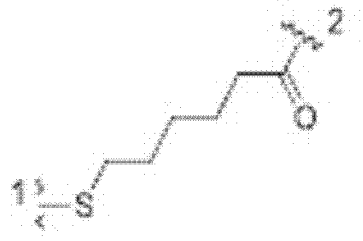
、



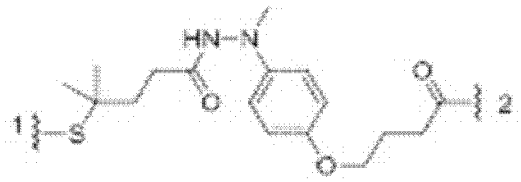
、



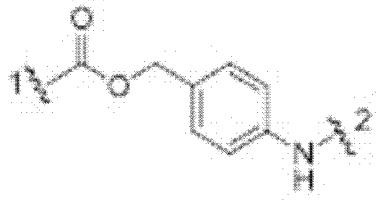
、



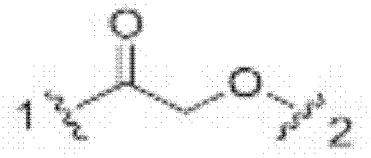
、



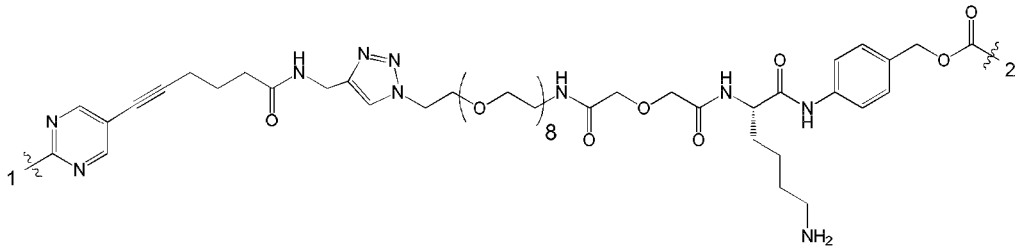
、



、

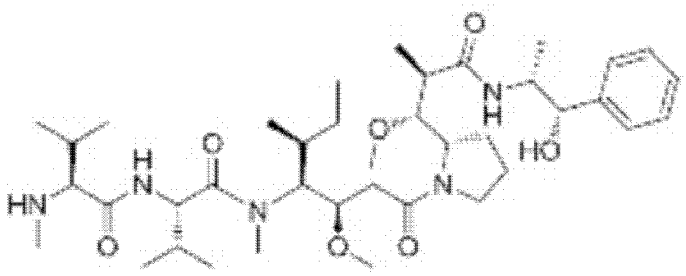


或

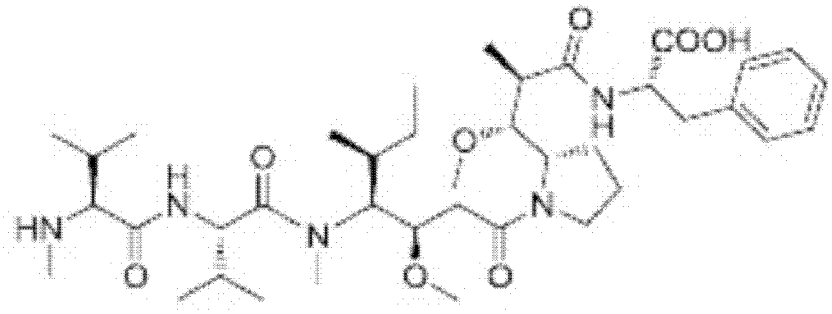


，其中 1 和 2 中的一个表示 L 与 A 连接的位置，另一个表示 L 与 D 连接的位置；

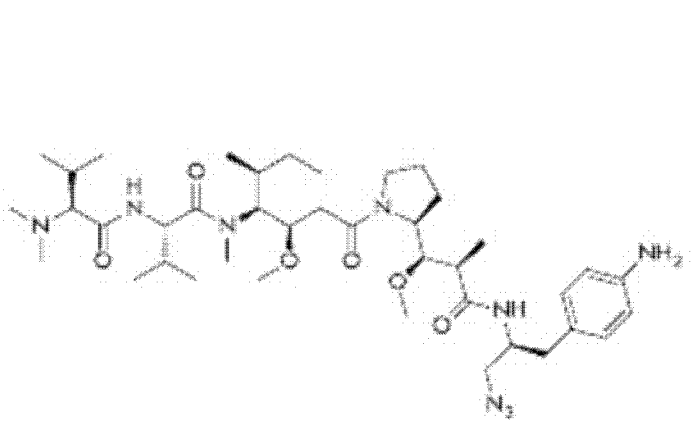
D 为治疗剂；优选地，D 选自细胞毒性剂、治疗性抗体、放射性同位素、寡核苷酸及其类似物、生物活性肽、蛋白毒素和酶；更优选地，D 为具有抗肿瘤生物活性的

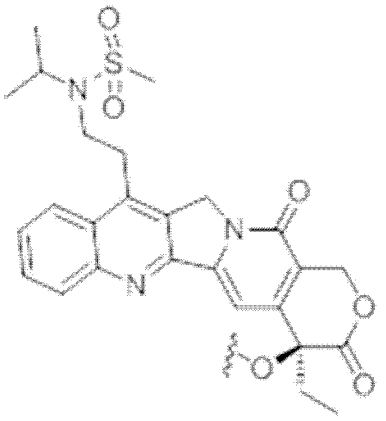


分子；进一步优选地，D 为 、



、

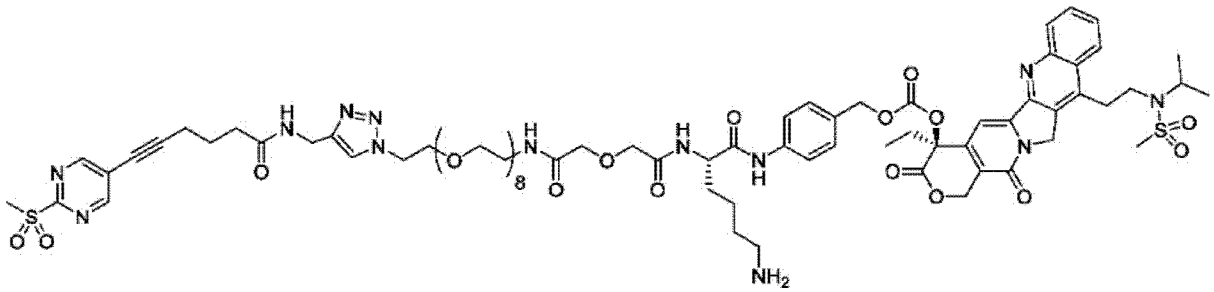




或 ；

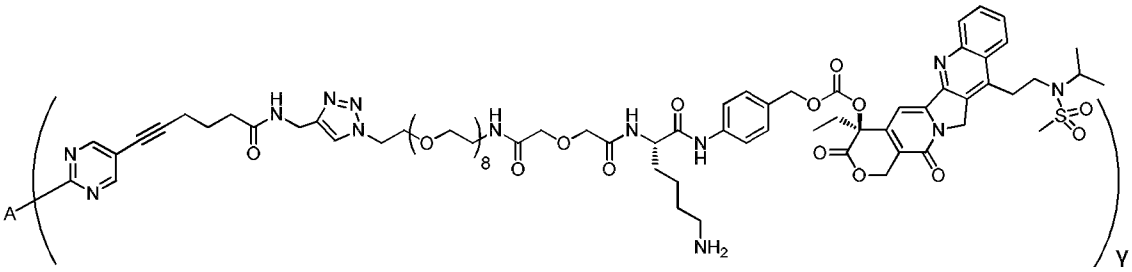
γ 表示连接至 A 的(L-D)部分的数量，其为 1-10 的整数。

在一具体实施方案中，(L-D)部分具有式(1)的结构，其通过与本发明的抗体或其抗原结合片段与具有式(1)结构的化合物上的巯基形成硫醚键而连接,



式(1)，

且本发明的抗体缀合物具有式(2)的结构：



(2)

其中 A 为本发明的抗体或抗原结合片段，γ 指通过与 A 的巯基形成硫醚键而连接至 A 的(L-D)部分的数量，其为 1-10 的整数。在一具体实施方案中，A 为本发明的抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体。

在又一方面，本发明提供一种组合物，其含有本发明的抗体缀合物。在一实施方案中，所述组合物中治疗剂与本发明的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段的摩尔比(DAR 值)为 1-10 之间的小数或整数，例如 1-8 之间的小数或整数，例如 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.79、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、6.95、7.0、7.03、7.1、7.12、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 或 8.0。

CAR 和表达 CAR 的免疫效应细胞

本发明的抗体或其抗原结合片段可用于构建嵌合抗原受体(CAR)。因此，在另一方面，本发明还提供一种嵌合抗原受体(CAR)。

如本文所用，术语“嵌合抗原受体(CAR)”是一种人工受体，其特异性识别并结合靶标(例如癌细胞表面上表达的抗原)，例如通过包含特异性结合癌细胞表面上的抗原的抗原结合片段，并且可以赋予在表面表达 CAR 的细胞(例如免疫效应细胞)靶标特异性。优选地，CAR 对靶标的识别导致表达 CAR 的免疫效应细胞的活化和/或扩增。

在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体包含本发明的特异性结合 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段(例如，scFv)、跨膜结构域、以及一个或多个细胞内 T 细胞信号结构域。在此类实施方案中，本发明还提供核酸分子，所述核酸分子可以包含编码嵌合抗原受体的核苷酸序列，所述编码嵌合抗原受体的核苷酸序列进一步包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段(例如 ScFv)的核苷酸序列。在某些实施方案中，本发明的核酸分子编码包含本发明抗体的抗原结合片段(例如 ScFv)的嵌合抗原受体。所述核酸分子可以是分离的。

在又一方面，本发明还提供一种免疫效应细胞，其经基因修饰从而在表面表达本发明的 CAR。优选地，免疫效应细胞选自 T 淋巴细胞(例如细胞毒性 T 细胞(CTL))、

自然杀伤细胞(NK)和自然杀伤 T 细胞(NKT)。免疫效应细胞靶向 Nectin-4 阳性的病变细胞(例如，Nectin-4 阳性的癌细胞)，并被激活以启动效应功能，例如，引起 Nectin-4 阳性的癌细胞的死亡。

在又一方面，本发明还涉及编码所述 CAR 的核酸分子、包含所述核酸分子的表达载体和表达所述 CAR 的免疫细胞(例如 CTL)。

药物组合物

本发明还提供药物组合物，其包含本发明的抗体或抗原结合片段、抗体缀合物、组合物、表达 CAR 的免疫效应细胞、多特异性抗体或融合蛋白，以及药学上可接受的载体和/赋形剂。

本文提供的药物组合物可以为多种剂型，包括但不限于固体、半固体、液体、粉末或冻干形式。

取决于剂型的不同，药学上可接受的载体和/或赋形剂可以包括但不限于：稀释剂、粘合剂和胶粘剂、润滑剂、崩解剂、防腐剂、媒介物、分散剂、助流剂、甜味剂、包衣、结构形成赋形剂、防腐剂、抗氧化剂(如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠、抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、α-生育酚、柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等)、增溶剂、胶凝剂、软化剂、溶剂(例如，水、酒精、乙酸和糖浆)、缓冲剂(例如，磷酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂和乙酸盐缓冲剂)、表面活性剂(例如非离子表面活性剂，例如聚山梨酯 80、聚山梨酯 20、泊洛沙姆或聚乙二醇)、抗细菌剂、抗真菌剂、等渗剂(例如海藻糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、乳糖、葡萄糖)、吸收延迟剂、螯合剂和乳化剂。

优选地，所述药物组合物适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(如通过注射或输注)。对于包含抗体或其抗原结合片段或者抗体缀合物的组合物而言，优选的剂型通常可以为例如注射液、冻干粉。对于包含抗体或其抗原结合片段或者抗体缀合物的组合物而言，合适的载体和/或赋形剂可以选自缓冲剂(例如柠檬酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液、组氨酸盐缓冲液)、等渗剂(例如海藻糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、乳糖、葡萄糖)、非离子表面活性剂(例如聚山梨酯 80、聚山梨酯 20、泊洛沙姆)或其组合。

药物组合物一般是无菌的并且在制备和贮存条件下稳定的。通过将活性物质(例如本发明的抗体或抗体缀合物)以需要的量混入合适的溶剂中，并且根据需要加入以上列举的载体和/或赋形剂中的一种或其组合，接着无菌微过滤，可制备无菌注射液。通常，通过将活性物质掺入到含有基本分散介质和上面所列其他所需成分的无菌载体和/或赋形剂中制备分散剂。对于用于制备无菌注射液的无菌粉末剂，优选的制备

方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干)，由其预先无菌过滤的溶液得到活性成分加任何额外所需成分的粉末。

可通过本领域已知的任何方法，例如通过全身或局部施用，将本文提供的药物组合物给药于对象。给药途径包括但不限于肠胃外(例如，静脉内、腹膜内、皮内、肌肉内、皮下或腔内)、局部、硬膜外或粘膜(例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部)。本领域技术人员应当理解，确切的给药剂量将取决于各种因素，例如药物组合物的代谢动力学性质、治疗的持续时间、特定化合物的排泄速率、治疗目的、给药途径和受试者的状况，例如患者的年龄、健康状况、体重、性别、饮食、病史，以及医学领域公知的其他因素。给药方法可以为例如注射或输注。

作为一般性指导，本发明的抗体缀合物的给药剂量范围可以为约 0.0001 至 100 mg/kg，更通常为 0.01 至 20 mg/kg 受试者体重。例如，给药剂量可以是 0.3 mg/kg 体重、1 mg/kg 体重、3 mg/kg 体重、5 mg/kg 体重，10 mg/kg 体重或 20 mg/kg 体重，或在 1-20 mg/kg 范围内。示例性的治疗方案需要每周给药一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每 3 个月一次、每 3-6 个月一次、或起始给药间隔略短后期给药间隔加长。给药方式可以是静脉滴注。

Nectin-4 相关疾病

本本发明的抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物、免疫效应细胞、多特异性抗体、融合蛋白或药物组合物，或由其所制备的药物可以用于治疗和/或预防疾病。所述疾病与 Nectin-4 相关。优选地，所述疾病与 Nectin-4 异常表达相关。术语“异常表达”指与正常状态的样品(或标准样品，例如未患有与 Nectin-4 异常表达相关疾病的对象的样品)相比，样品中蛋白表达水平过高或过低。

优选地，所述疾病以 Nectin-4 高表达为特征。例如，患有或怀疑患有疾病(例如膀胱癌)的对象的组织(例如膀胱)中高表达 Nectin-4，而未患有所述疾病的对象的所述组织中不表达或低表达 Nectin-4。

优选地，所述疾病为癌症。优选地，所述癌症选自胃癌、肝癌、肝细胞癌、膀胱癌、尿路上皮癌、尿道癌、肾盂癌、输尿管癌、肺癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、乳腺导管癌、三阴性乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、结肠癌、直肠癌和食管癌。

癌症治疗可以通过例如但不限于从肿瘤退化程度、肿瘤重量或大小的变化、进展时间、存活时间、无进展存活、总体应答率、应答持续时间、生活质量、蛋白质表达和/或活性等方面评估。

诊断和治疗用途

本发明的抗Nectin-4抗体或其抗原结合片段或抗体缀合物可用于诊断目的，以检测、诊断或监测与 Nectin-4 相关的疾病和/或病症。例如，本发明提供的抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段或抗体缀合物可以用于原位、体内、离体和体外诊断测定或成像测定。

在一些实施方案中，为检测对象中 Nectin-4 的表达水平和/或追踪表达 Nectin-4 的细胞，可以将本发明的抗体或抗原结合片段与至少一种标记缀合来获得标记的抗体。这类标记的抗体也包含在本发明的抗体或抗原结合片段的范围内。优选地，所述标记选自酶(例如辣根过氧化物酶)、荧光染料、放射性同位素、生物素和胶体金。将标记与抗体缀合的技术是本领域技术人员熟知的。

在一方面，本发明提供了检测样品中 Nectin-4 的存在或确定其表达水平的方法，其包括：

(a) 使用本发明的抗体或抗原结合片段或者标记的抗体与样品接触；

(b) 检测所述抗体或抗原结合片段与所述样品中 Nectin-4 之间免疫复合物的形成或确定所述免疫复合物的量，以检测样品中 Nectin-4 的存在或确定样品中 Nectin-4 的表达水平。

本发明还提供诊断对象中与 Nectin-4 相关的疾病的方法，其包括：

(a) 获得对象的样品；

(b) 使用本发明的抗体或抗原结合片段或者标记的抗体检测所述样品中 Nectin-4 表达水平；

(c) 将 Nectin-4 的表达水平与参考蛋白的表达水平进行比较，其中 Nectin-4 表达水平与参考蛋白表达水平相比增加或降低表示 Nectin-4 异常表达。

所述参考蛋白可以是标准样品中的 Nectin-4，所述标准样品可以例如是未患有与 Nectin-4 异常表达相关疾病的对象的样品。所述样品可以是任何形式，例如细胞、组织、体液。以上检测可以利用本领域已知的技术来进行，这类技术包括但不限于蛋白质免疫印记、流式细胞术、免疫组织化学测定(IHC)、ELISA 测定。

本发明还涉及本发明的抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物、免疫效应细胞、多特异性抗体、融合蛋白或药物组合物在治疗和/或预防疾病中的用途。

本发明还涉及本发明的抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物、免疫效应细胞、多特异性抗体、融合蛋白或药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗和/或预防疾病。在一实施方案中，所述疾病为本文所述的癌症。

本发明的抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物、免疫效应细胞、多特异性抗体、融合蛋白或药物组合物可以与至少一种或多种本文所述的治疗剂联合施用。联合施用的方式没有限制。例如，可以将上述治疗剂全部在一次施用或分开施用。当分开施用时(采用互相不同的施用方案的情况下)，它们可以连续施用而不中断或以预定的

间隔施用。

治疗方法

本发明还提供了一种治疗有需要的受试者中疾病的方法，所述疾病与 Nectin-4 相关。在一实施方案中，所述疾病为本文所述的癌症。

所述方法包括向所述受试者给药治疗有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物、组合物、免疫效应细胞、多特异性抗体、融合蛋白或药物组合物。

在某些实施方案中，本发明的方法还包括施用选自以下的治疗方案：手术、放疗、化疗、靶向治疗、免疫治疗、激素治疗、血管生成抑制和姑息治疗。

在某些实施方案中，本发明的方法还包括进一步施用选自以下的一种或多种治疗剂：化疗剂、放射性同位素、免疫检查点抑制剂、靶向其他抗原的抗体和其他抗肿瘤药物。化疗剂可以包括例如：抗代谢药、烷化剂、细胞毒性剂、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制剂。其他抗肿瘤药物可以包括例如：血管生成抑制因子、脱乙酰化酶(HDAC)抑制因子、Hedgehog信号通路阻滞剂、mTOR抑制剂、p53/mdm2抑制剂、PARP抑制剂、蛋白酶体抑制剂(例如bortezomib、carfilzomib、ixazomib、Marizomib、Oprozomib)以及酪氨酸激酶抑制剂(例如BTK抑制剂)。化疗剂的实例包括但不限于：环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、白消安、氮芥、苯丁酸氮芥、环己硝脲、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、顺铂(DDP)、卡铂(CBP)、奥沙利铂(OXA)、甲氨蝶呤(MTX)、6-巯基嘌呤(6-MP)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、阿糖胞苷、吉西他滨、长春碱、长春新碱、长春地辛、喜树碱、伊立替康、拓扑替康、卢比替康、依托泊苷、替尼泊苷、紫杉醇、紫杉烷、多西他赛、紫杉醇脂质体、放线菌素D、伊达比星、多柔比星、表柔比星、丝裂霉素、博来霉素、阿霉素、表阿霉素。免疫检查点抑制剂包括但不限于特异性结合PD-1、PD-L1、CTLA4、LAG-3、TIM-3或VISTA的抗体或其抗原结合片段。放射性同位素可以包括例如^{212}Bi、^{213}Bi、^{131}I、^{125}I、^{111}In、^{177}Lu、^{186}Re、^{188}Re、^{153}Sm、^{90}Y。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物、免疫效应细胞、多特异性抗体、融合蛋白或药物组合物与化疗剂联合使用。在一实施方案中，化疗剂选自顺铂、奥沙利铂、吉西他滨、环磷酰胺、5-氟尿嘧啶及其组合。在另一些实施方案中，本发明的抗体缀合物与免疫检查点抑制剂联合使用。在一实施方案中，免疫检查点抑制剂选自抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、抗PD-1抗体或其抗原结合片段及其组合。在又一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物、免疫效应细胞、多特异性抗体、融合蛋白或药物组合物与放射性同位素联合使用。

试剂盒

本发明还提供试剂盒，其包含本发明的抗体或抗原结合片段、抗体缀合物、标记的抗体、多特异性抗体、融合蛋白、药物组合物或免疫效应细胞，以及使用说明。试剂盒还可以包含合适的容器。在某些实施方案中，试剂盒还包含给药的装置。通常，试剂盒还包括标签，其用于表明试剂盒内容物的预期用途和/或使用方法。术语“标签”包括在试剂盒上或与试剂盒一起提供的或以其他方式随试剂盒提供的任何书面的或记录的材料。

有益效果

在一具体方面，本发明提供了抗 Nectin-4 抗体或其抗原结合片段，特别是抗 Nectin-4 人源化单克隆抗体。本发明的抗体对 Nectin-4 具有高亲和力：实施例中使用多种方法检测本发明的抗体对 Nectin-4 的结合亲和力，例如 ELISA、生物膜干涉技术和流式细胞术，结果表明本发明的抗 Nectin-4 抗体对体外纯化的 Nectin-4 和细胞表面 Nectin-4 都有较高的亲和力。出人意料地，人源化单克隆抗体 31HZ、56HZ 及 74HZ 与人 Nectin-4、食蟹猴 Nectin-4 的动态亲和力均优于现有技术 Enfortumab，表明在体内结合活性方面，本发明的抗体对 Nectin-4 具有更高的亲和力；抗体 31HZ、56HZ 及 74HZ 更高的内吞活性也证实了这一点。而且，本发明的抗体对 Nectin-4 具有高特异性：31HZ、56HZ、74HZ 均特异性识别人 Nectin-4，不识别 Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3。另外，本发明的抗体阻断 Nectin-4 与 Nectin-1 的结合，并且 31HZ、56HZ 及 74HZ 对 Nectin-4 的竞争结合能力与 Enfortumab 相当。

在另一具体方面，本发明还提供了抗 Nectin-4 抗体缀合物，其可以靶向 Nectin-4 阳性细胞。本发明的抗体缀合物能够高亲和性、高特异性地靶向 Nectin-4 阳性细胞，这对于治疗癌症或体内诊断非常有利，因为高亲和力和特异性可以降低脱靶毒性效应，减少副作用。实施例也证实了这一点，本发明的 ADC 对内源表达人 Nectin-4 的多种肿瘤细胞系，例如人乳腺导管癌细胞、人胃癌细胞、人乳腺癌细胞，均有较强的杀伤活性。更进一步地，在小鼠非小细胞肺癌移植瘤模型中，本发明的 ADC 表现出显著的肿瘤抑制活性，并且具有良好的安全性。

附图说明

图 1A 显示了 A549-Nectin-4 稳定细胞系流式检测结果。

图 1B 显示了 T24-Nectin-4 稳定细胞系流式检测结果。

图 2 显示了抗人 Nectin-4 鼠源抗体的亲和力检测结果。

图 3A 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 31HZ 与人 Nectin-4 蛋白亲和力 ELISA 检测结果。

图 3B 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 74HZ 与人 Nectin-4 蛋白亲和力 ELISA 检测结果。

图 3C 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 56HZ 与人 Nectin-4 蛋白亲和力 ELISA 检测结果。

图 3D 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 31HZ 与食蟹猴 Nectin-4 蛋白亲和力 ELISA 检测结果。

图 3E 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 74HZ 与食蟹猴 Nectin-4 蛋白亲和力 ELISA 检测结果。

图 3F 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 56HZ 与食蟹猴 Nectin-4 蛋白亲和力 ELISA 检测结果。

图 4A 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 31HZ、74HZ 与 T47D 细胞亲和力流式检测结果。

图 4B 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 56HZ 与 NCI-N87 细胞亲和力流式检测结果。

图 5A 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 31HZ、74HZ 在 T47D 细胞上内吞活性检测结果。

图 5B 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 31HZ、74HZ 在 MDA-MB-468 细胞上内吞活性检测结果。

图 5C 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 31HZ、74HZ 在 A549-Nectin-4 细胞上内吞活性检测结果。

图 5D 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 56HZ 在 T24-Nectin-4 细胞上内吞活性检测结果。

图 6A 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 31HZ、74HZ 识别人 Nectin-4 结构域检测结果。

图 6B 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 56HZ 识别人 Nectin-4 结构域检测结果。

图 7A 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 31HZ、74HZ 竞争活性检测结果。

图 7B 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 56HZ 竞争活性检测结果。

图 8A 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 31HZ 特异性检测结果。

图 8B 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 74HZ 特异性检测结果。

图 8C 显示了抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 56HZ 特异性检测结果。

图 9A 显示了抗人 Nectin-4 ADC 31HZ-TL001、74HZ-TL001 对 A549-Nectin-4 细胞的杀伤结果。

图 9B 显示了抗人 Nectin-4 ADC 31HZ-TL001、74HZ-TL001 对 A549 细胞的杀伤结果。

图 9C 显示了抗人 Nectin-4 ADC 31HZ-TL001、56HZ-TL001 对 T24-Nectin-4 细胞的杀伤结果。

图 9D 显示了抗人 Nectin-4 ADC 31HZ-TL001、56HZ-TL001 对 T24 细胞的杀伤结果。

图 10A 显示了抗人 Nectin-4 ADC 31HZ-TL001、74HZ-TL001 对 T47D 细胞的杀伤结果。

图 10B 显示了抗人 Nectin-4 ADC 31HZ-TL001、74HZ-TL001 对 MDA-MB-468 细胞的杀伤结果。

图 10C 显示了抗人 Nectin-4 ADC 31HZ-TL001、56HZ-TL001 对 NCI-N87 细胞的杀伤结果。

图 11 显示了 NOD/SCID 小鼠皮下 NCI-H322M 细胞移植瘤模型中各组小鼠肿瘤体积随时间的变化情况。

图 12 显示了 NOD/SCID 小鼠皮下 NCI-H322M 细胞移植瘤模型中各组小鼠体重随时间的变化情况。

图 13 显示了 NOD/SCID 小鼠皮下 HuPrime®胃癌 BL9200 PDX 模型中各组小鼠肿瘤体积随时间的变化情况。

图 14 显示了 NOD/SCID 小鼠皮下 HuPrime®胃癌 BL9200 PDX 模型中各组小鼠体重随时间的变化情况。

实施例

以下实施例旨在仅对本发明进行举例说明，因此并不应被视为以任何方式限制本发明。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书进行。

实施例 1 抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体的制备

1.1 人 Nectin-4 过表达细胞系构建

为验证人 Nectin-4 抗体的特异性及功能，将人 Nectin-4 (Uniprot ID：Q96NY8-1)的完整编码序列(由南京金斯瑞生物科技有限公司合成)克隆到慢病毒载体 pLVX-IRES-puro 上，并通过文献所述(Mohammadi Z et al., Mol Biotechnol. 2015 Sep;57(9):793-800)慢病毒包装系统制备病毒，获得病毒后分别感染 A549 非小细胞肺癌细胞(ATCC)与 T24 人膀胱移行细胞癌细胞(ATCC)，通过嘌呤霉素筛选及单克隆挑选，

获得过表达人 Nectin-4 的单克隆的 A549-Nectin-4 稳定细胞系及 T24-Nectin-4 稳定细胞系。

1.2 人 Nectin-4 过表达细胞系检测

A549-Nectin-4 及 T24-Nectin-4 稳定细胞系采用流式细胞术(流式细胞仪：Beckman，CytoFlex；检测抗体 Enfortumab，序列来自于国际专利申请公布号：WO2012/047724)进行鉴定，确定细胞正确表达人 Nectin-4。如图 1A 及 1B 所示，流式结果显示 A549-Nectin-4、T24-Nectin-4 均获得阳性率高(接近 100%)，表明 A549-Nectin-4 和 T24-Nectin-4 为均一性良好的稳定细胞系，可用于后续实验。

1.3 抗人 Nectin-4 鼠源单克隆抗体的制备

采用蛋白免疫的方式免疫野生型小鼠，获得抗人 Nectin-4 鼠源单克隆抗体。用完全弗氏佐剂(CFA)乳化人 Nectin-4 蛋白(义翘神州，Cat: 19771-H08H)免疫 Babl/c 和 C57 小鼠 5-6 周龄各 2 只，具体为：50 μg 进行皮下初免，之后采用弗氏不完全佐剂(IFA)乳化 Nectin-4 蛋白，每 2 周 25 μg 进行腹腔加强免疫，3 次加强以后，采用内源表达 Nectin-4 的肿瘤细胞 T47D 5×10^6 细胞(一种人乳腺管癌细胞)进行腹腔最后加强，3-5 天后取脾脏细胞进行杂交瘤融合。采用标准的融合流程用 PEG 融合的方式将小鼠脾脏细胞和 Sp2/0 (ATCC，Cat# CRL-1581)小鼠骨髓瘤细胞系进行融合，之后采取 HAT 加压筛选，10-14 天后进行 ELISA 筛选，获得结合 Nectin-4 蛋白的阳性克隆约 200 个。通过流式细胞仪进一步筛选，获得 3 个能够识别 T47D 肿瘤细胞的阳性杂交瘤克隆进行亚克隆，最后通过有限稀释法进行亚克隆分选以获得单克隆，它们的编号分别为：31#、56#以及 74#。

1.4 抗人 Nectin-4 鼠源抗体的亲和力检测

通过 ELISA 方法检测候选分子与人 Nectin-4 亲和力。将杂交瘤单克隆 31#、56#以及 74#无血清培养，获得 3-10 mL 上清，然后通过 Protein A (MabSelect SuRe, GE)进行纯化获得鼠源抗体。

采用 ELISA 对从杂交瘤细胞株 31#、56#以及 74#的培养上清中分离纯化的鼠源单克隆抗体进行亲和力的测定。用碳酸盐(CBS)缓冲液将人 Nectin-4 (义翘神州，Cat: 19771-H08H)稀释至 1 μg/mL，以 100 μL/孔的体积加于 96 孔板中，4℃放置 16-20 h。将 96 孔板中 CBS 缓冲液吸掉，用 PBST (pH 7.4，PBS 含 0.05% 吐温 20)缓冲液洗板 1 次后，加入 200 μL/孔含有 2% PBST 的脱脂奶粉(封闭液)，室温孵育 1h 封闭。移去封闭液，用 PBST 缓冲液洗板 3 次后，将待测抗 Nectin-4 鼠源抗体用 PBST/2% 脱脂奶粉稀释至适合浓度，然后加入至 100 μL/孔，室温孵育 1.5 h。移去反应体系，用 PBST 洗板 3 次后，50 μL/孔加入用 PBST/1%脱脂奶粉稀释(稀释比例 1:5000)的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗(购自 The Jackson Laboratory)，室温孵育 1 h。PBST 洗

板 3 次后，加入 100 μL/孔 TMB，室温孵育显色 5-10 min。加入 50 μL/孔 0.2 M 硫酸终止显色。酶标仪在双波长 450/620 nm 处检测吸光值(O.D.)。

检测结果如图 2 与表 3 所示，3 个抗人 Nectin-4 鼠源抗体均能高亲和力结合人 Nectin-4 蛋白，EC_{50} 在 30 至 70 pM 之间。

表 3 抗人 Nectin-4 亲和力检测

克隆编号	EC_{50} (pM)
31#	54.95
56#	36.33
74#	69.39

1.5 抗 Nectin-4 鼠源单抗的可变区扩增

杂交瘤细胞培养到 8000-10000 个左右，细胞裂解并采用 cDNA 反转录试剂盒(Thermo Fisher Sci. Cat# 18080-200)合成第一链 cDNA。采用引物从 cDNA 中 PCR 方式扩增 VH 和 VK 基因，PCR 产物通过 DNA 纯化试剂盒(Qiagen, Cat#28104)纯化，并连接到 PUC57 载体上。每一个连接反应大概挑取 5 个克隆进行测序。序列通过 Vector NTI 11.5 (Thermo Fisher Sci.)和 Sequencer 5.4.6 (Genecodes)进行分析。再通过 IMGT 以及 abYsis 获得抗人 Nectin-4 鼠源抗体可变区序列以及 CDR 序列如下表 4 所示。

表 4 抗人 Nectin-4 鼠源抗体可变区及 CDR 氨基酸序列

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

注：VH、VL、CDR-H1、CDRH2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 列中的数字表示各自对应的 SEQ ID NO，例如抗体 31#的 VH 对应 SEQ ID NO: 1，VL 对应 SEQ ID NO: 2。

1.6 抗人 Nectin-4 鼠源抗体的人源化

采用 CDR 移植抗体人源化改造方法对鼠源抗体 31#、56#、74#进行人源化改造。简言之，人源化改造涉及以下步骤：把鼠源单克隆抗体的氨基酸序列与人胚系抗体

氨基酸序列进行比对，找出同源性高、理化性质较优的序列，作为人胚系框架序列；分析考察 HLA-DR 亲和性，选出亲和力低的人胚系框架序列；再将鼠源抗体的六个 CDR 分别移植到选定的重链及轻链框架序列上。

进一步利用计算机模拟技术，应用分子对接分析可变区及其周边的框架氨基酸序列，考察其空间立体结合方式。通过计算静电力、范德华力、亲疏水性和熵值，分析该鼠源抗体氨基酸序列中可与 Nectin-4 蛋白作用以及维护空间构架的关键氨基酸，并在移植后的抗体中，保留这些鼠源的氨基酸。也即，对上述人源化模板的 FR 区氨基酸残基进行了一系列的回复突变，以使人源化抗体尽可能保留鼠源抗体的抗原结合能力。

根据以上方法，以鼠源抗体 31#、56#、74#的 CDR 为基础构建人源化抗体，分别命名为 31HZ、56HZ 以及 74HZ；其中，各抗体的重链恒定区均为人 IgG1 重链恒定区(SEQ ID NO: 61)，各抗体的轻链恒定区均为人 Kappa 轻链恒定区(SEQ ID NO: 62)。构建的人源化抗体 31HZ、56HZ 以及 74HZ 的轻链 CDR 氨基酸序列分别和 31#、56#、74#的轻链 CDR 一致。构建的人源化抗体 31HZ、56HZ 以及 74HZ 的重链 CDR 氨基酸序列如 5.1 所示：

表 5.1 抗人 Nectin-4 人源化抗体的重链 CDR 氨基酸序列

CDRH 组	**编号系统**	**CDR-H1 (SEQ ID NO:)**	**CDR-H2 (SEQ ID NO:)**	**CDR-H3 (SEQ ID NO:)**
56HZCDRH-a	Chothia	GYFNSITSDY (18)	SFSGR (22)	GNYDGFDY (23)
56HZCDRH-b	Abm	GYFNSITSDYDWH (36)	YISFSGRTY (28)	
56HZCDRH-c	Kabat	ITSDYDWH (44)	YISFSGRTYYNPSLKS (30)	
56HZ CDRH-d	IMGT	GYFNSITSDYD (54)	ISFSGRT (32)	ARGNYDGFDY (33)
31HZ CDRH-a	Chothia	GYTFTDY (3)	HPSDSE (4)	WDFRIYYAMDY (5)
31HZ CDRH-b	Abm	GYTFTDYWMN (9)	MIHPSDSETR (10)	
31HZ CDRH-c	Kabat	DYWMN (11)	MIHPSDSETRLNQKFQG (63)	
31HZ CDRH-d	IMGT	GYTFTDYW (13)	IHPSDSET (14)	ARWDFRIYYAMDY (15)
74HZ CDRH-a	Chothia	GYTFINY (39)	HPSDSA (40)	WGNFYTVNAWYYFDY (41)
74HZ CDRH-b	Abm	GYTFINYWMN (45)	MIHPSDSATR (46)	
74HZ CDRH-c	Kabat	NYWMN (47)	MIHPSDSATRLNQSFQG(64)	
74HZ CDRH-d	IMGT	GYTFINYW (49)	IHPSDSAT (50)	ARWGNFYTVNAWYYFDY (51)

进一步人源化抗体 31HZ、56HZ 以及 74HZ 三个抗体的可变区及恒定区氨基酸序列如表 5.2 所示：

表 5.2 抗人 Nectin-4 人源化抗体可变区及恒定区氨基酸序列

抗体名	重链可变区 (SEQ ID NO:)	轻链可变区 (SEQ ID NO:)	重链恒定区 (SEQ ID NO:)	轻链恒定区 (SEQ ID NO:)
31HZ	55	56	61	62
56HZ	57	58		
74HZ	59	60		

1.7 抗人 Nectin-4 人源化抗体的制备

将上述抗人 Nectin-4 人源化抗体的重链和轻链氨基酸序列通过密码子优化合成连接入质粒 ptt5 (委托南京金斯瑞生物科技有限公司)。重链和轻链对应的质粒同时转染到 CHO-E 细胞中，将上清通过 protein A (MabSelect SuRe, GE)进行纯化后获得抗人 Nectin-4 人源化抗体。

实施例 2 抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体亲和力检测

2.1 抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体与不同种属 Nectin-4 蛋白亲和力检测

采用 ELISA 法检测抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体与不同种属 Nectin-4 蛋白亲和力。具体步骤如下：用 CBS 包被液(称取 0.32 g Na_2CO_3、0.59 g $NaHCO_3$，去离子水溶解，定容至 200 mL)稀释人 Nectin-4 或食蟹猴 Nectin-4 抗原至 1 μg/mL，100 μL 每孔包被至酶标板中，4°C 过夜；第二天弃去孔中液体，用 300 μL PBS 清洗一次；加入 100 μL PBS (含 2% BSA，购自 BOVOGEN，货号 BSAS 1.0)，37°C 封闭 2 小时；用 PBS (含 2% BSA)稀释 31HZ、56HZ、74HZ 及 Enfortumab 抗体(1500 ng/mL 起始，3 倍稀释，11 个浓度点)，取 100 μL 加入对应的孔中，37°C 孵育 2 小时；300 μL PBST 清洗 3 次；用 PBS (含 2% BSA)按 1:10000 比例稀释 HRP 标记的羊抗人二抗(购自 Jackson，109-035-00)，取 100 μL 加入对应的孔中，37°C 孵育 1 小时；300 μL PBST 清洗 5 次；加入 100 μL TMB 显色液(购自湖州英创，TMB-S-004)至对应的孔中，室温显色 5-20 分钟；加入 50 μL 2 N H_2SO_4 终止，酶标仪(购自 MD，SpectraMax M2) OD450 nm 读数并导入 Graphpad Prism 进行曲线拟合。

实验结果如图 3A-3F 及表 6 所示，31HZ 与人 Nectin-4 蛋白、食蟹猴 Nectin-4 蛋白亲和力优于 Enfortumab；56HZ、74HZ 与人 Nectin-4 蛋白、食蟹猴 Nectin-4 蛋白亲和力与 Enfortumab 基本相当。

表 6 抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体与不同种属 Nectin-4 蛋白亲和力检测

抗体名称	EC_{50} (ng/mL)	
	人 Nectin-4 蛋白	食蟹猴 Nectin-4 蛋白
31HZ	3.60	4.45
56HZ	9.48	9.85
74HZ	8.34	6.73
Enfortumab	7.10±2.00 (n=3)	6.00±0.66 (n=3)

2.2 抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体与不同种属 Nectin-4 蛋白动态亲和力检测

使用 Octet Fortebio ®测定抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体的动态亲和力。主要测定步骤为：首先将抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体(浓度为 5 μg/mL)固定到 ProA 传感器上，然后与人或食蟹猴 Nectin-4(梯度稀释到 400 nM、200 nM、100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、0 nM)进行结合反应，充分反应后的固相结合物在 PBST 缓冲液中进行解离反应。实验结束后在 Data Analysis 11.0 软件打开，选用 1:1 模式，整体拟合(global fitting)，对结果进行分析，获得抗体与抗原的亲和力常数。

实验结果如表 7 所示，31HZ、56HZ 及 74HZ 与人 Nectin-4 蛋白、食蟹猴 Nectin-4 蛋白动态亲和力均优于 Enfortumab。

表 7 抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体与不同种属 Nectin-4 蛋白动态亲和力检测

抗体名称	K_D ($\times 10^{-9}$ M)	
	人 Nectin-4 蛋白	食蟹猴 Nectin-4 蛋白
31HZ	22.50	14.50
56HZ	19.60	18.40
74HZ	12.10	9.540
Enfortumab	28.30±2.90 (n=2)	33.60±3.50 (n=2)

2.3 抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体与肿瘤细胞膜表面人 Nectin-4 亲和力检测

采用 T47D 细胞检测 31HZ、74HZ 与细胞膜表面人 Nectin-4 亲和力。具体步骤如下：消化 T47D 细胞，离心重悬，PBS 洗两次；用 PBS (含 1% BSA)重悬细胞，按 3×10^5 细胞/孔铺细胞至 96 孔尖底板中，每孔 50μl 体积；在每个孔中分别加入 50 μL 待检抗体，终浓度 15 μg/mL 起始，4 倍梯度稀释，共 10 个浓度点；以 Human IgG 作为阴性对照；混匀，4℃避光反应 1 小时；PBS 洗 3 次，加入 FITC 标记的抗人 Fc 二抗(品牌：BioLegend，货号：409322)，4℃避光孵育 0.5 小时；PBS 洗 3 次，流式

上机(流式细胞仪品牌：Beckman，型号：Cytoflex)检测。

用相同方法检测 56HZ 与 NCI-N87 细胞(一种人胃癌细胞,ATCC)膜表面人 Nectin-4 亲和力，抗体按 3.33 μg/mL 起始，3 倍稀释，10 个浓度点。

实验结果如图 4A、4B 及表 8 所示，31HZ、56HZ 与细胞膜表面 Nectin-4 亲和力与 Enfortumab 相当。

表 8 抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体与肿瘤细胞膜表面人 Nectin-4 亲和力检测

抗体名称	EC_{50} (ng/mL)	
	T47D	NCI-N87
31HZ	12.29	/
56HZ	/	16.39
74HZ	22.28	/
Enfortumab	10.11	22.07

注：/：未检测。

实施例 3 抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体内吞活性检测

采用流式细胞术检测抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体内吞活性。具体步骤如下：取 T47D、MDA-MB-468 (一种人乳腺癌细胞，ATCC)或 A549-Nectin-4 细胞，胰酶消化计数，用 PBS(含 1% BSA)重悬细胞，调整细胞密度至 3×10^6/mL；取 100 μL 重悬后细胞，加入终浓度为 10 μg/mL 的待检测抗体 31HZ,56HZ，74HZ，以同型 Human IgG 作为阴性对照，冰上孵育 1 小时；孵育完成后用预冷 PBS 洗 3 次，用细胞培养基重悬细胞并将细胞分为两部分，一部分放置在 37℃细胞培养箱中孵育 1、2、4 小时(内吞组)，另一部分继续在冰上孵育 1、2、4 小时(亲和力组)；孵育结束后，预冷 PBS 洗 3 次，用 50 μL PBS(含 1% BSA)重悬细胞，加入抗人荧光二抗(BioLegend)，4℃孵育半小时；孵育结束后，预冷 PBS 洗 3 次，然后通过流式细胞仪(Beckman)检测细胞上的荧光信号(表示为平均荧光强度(MFI))并按公式：内吞比例(%)=[1-($MFI_{37℃抗体组}$- $MFI_{37℃对照组}$)/($MFI_{冰上抗体组}$ – $MFI_{冰上对照组}$)] ×100%计算出抗体在内吞率。

用相同方法检测 56HZ 在 T24-Nectin-4 细胞上的内吞活性。

实验结果如图 5A-5D 所示，31HZ、56HZ 及 74HZ 内吞活性优于 Enfortumab。

实施例 4 抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体结合人 Nectin-4 结构域检测

人 Nectin-4 含有 1 个 IgV 结构域及 2 个 IgC 结构域。为检测抗人 Nectin-4 人源化

单克隆抗体结合的结构域，构建了过表达 Nectin-4 IgV 结构域的 A549 稳定细胞系 A549-Nectin-4-IgV，以及过表达 Nectin-4 的 2 个 IgC 结构域的 A549 稳定细胞系 A549-Nectin-4-IgCC，并通过流式法检测待检抗体结合的结构域，具体步骤如下：消化 A549-Nectin-4-IgV 及 A549-Nectin-4-IgCC 细胞，离心重悬，PBS 洗两次；用 PBS (含 1% BSA)重悬细胞，按 300000 细胞/孔铺细胞至 96 孔尖底板中，每孔 50 μl 体积；在每个孔中分别加入 50 μL 终浓度为 40 μg/mL 待检抗体，并以 Human IgG 作为阴性对照；混匀，4℃避光反应 1 小时；PBS 洗 3 次，加入 FITC 标记的抗人 Fc 二抗(品牌：BioLegend，货号：409322)，4℃避光孵育 0.5 小时；PBS 洗 3 次，流式上机(流式细胞仪品牌：Beckman，型号：Cytoflex)检测。

实验结果如图 6A、6B 所示，31HZ、56HZ、74HZ 及 Enfortumab 均只结合人 Nectin-4 的 IgV 结构域，不结合 IgC 结构域。

实施例 5 抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体竞争活性检测

人 Nectin-4 通过 IgV 结构域与另一个 Nectin-4 分子或 Nectin-1 分子连接。因 31HZ、56HZ 及 74HZ 均结合 Nectin-4 的 IgV 结构域，通过竞争 ELISA 法检测三者的竞争活性，具体步骤如下：用 CBS 包被液稀释 Nectin-4 蛋白至 2 μg/mL，100 μL 每孔，37℃孵育两小时；300 μL PBST 清洗一次，加入 PBS (2% BSA)，100 μL 每孔，37℃孵育 2 小时；用 PBS (2% BSA)稀释生物素标记的 Nectin-1-hFc 至 20 μg/mL；用 PBS (2% BSA)稀释待检测抗体，31HZ、74HZ 按照 3.73 μg/mL 起始，3 倍稀释，9 个浓度点；56HZ 按照 1.25 μg/mL 起始，2 倍稀释，10 个浓度点；将上述两种稀释好的溶液等体积混匀后，100 μL/孔加入至对应孔中，室温孵育 2 小时；300 μL PBST 清洗三次；用 PBS (2% BSA)按 1:10000 比例稀释 HRP-streptavidin，100 μL/孔加入至对应孔中，室温度孵育 1 小时；300 μL PBST 清洗五次；加入 100 μL TMB 对应的孔中，室温显色 10 分钟；加入 50 μL 2 N H_2SO_4 终止，酶标仪 450 nm 读数。

实验结果如图 7A、7B 所示，31HZ、56HZ 及 74HZ 均能够竞争抑制人 Nectin-4 与人 Nectin-1 的结合，其竞争 IC_{50} 值分别为 27.62 ng/mL、26.90 ng/mL、27.22 ng/mL，与 Enfortumab (27.11 ng/mL)相当。

实施例 6 抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体特异性检测

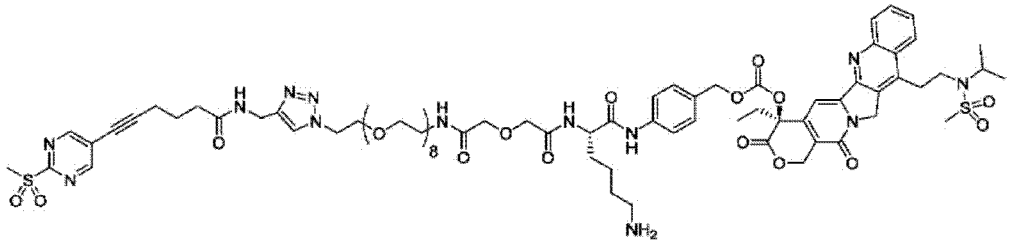
Nectin 家族成员包括 Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3 及 Nectin-4，成员之间序列同源性为 25%左右，但结构和功能比较类似。为检测本文中的抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体是否只识别 Nectin-4，不识别 Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3，采用 ELISA 法检测待检抗体的特异性。具体步骤如下：用 CBS 包被液稀释人 Nectin-1、Nectin-2、

Nectin-3 及 Nectin-4 抗原至 1 μg/mL，100 μL 每孔包被至酶标板中，4°C 过夜；第二天弃去孔中液体，用 300 μL PBS 清洗一次；加入 100 μL PBS (含 2% BSA)，37°C 封闭 2 小时；用 PBS (含 2% BSA)稀释 31HZ、56HZ、74HZ 及 Enfortumab 抗体，取 100 μL 加入对应的孔中，37°C 孵育 2 小时；300 μL PBST 清洗 3 次；用 PBS (含 2% BSA)按 1:10000 比例稀释 HRP 标记的羊抗人二抗，取 100 μL 加入对应的孔中，37°C 孵育 1 小时；300 μL PBST 清洗 5 次；加入 100 μL TMB 显色液至对应的孔中，室温显色 5-20 分钟；加入 50 μL 2 N H_2SO_4 终止，酶标仪 OD450 nm 读数并导入 Graphpad Prism 进行曲线拟合。

实验结果如图 8A、8B、8C 所示，31HZ、56HZ、74HZ 均特异性识别人 Nectin-4，不识别 Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3。

实施例 7 抗人 Nectin-4 ADC 的制备

采用 TL001 与抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体进行偶联，制备抗人 Nectin-4 ADC，TL001 具有式(1)的结构：



式(1)

TL001 的制备方法请参见 WO2019/114666 中的描述，其相关内容整体援引加入本文。

抗人 Nectin-4 抗体缀合物(抗人 Nectin-4 ADC)制备方法如下：

(1) 偶联：取抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体 30 mg，用稀释液(20 mM PB+105 mM NaCl，pH 7.7)稀释，加入终浓度为 5 mM 的依地酸钠溶液，混匀；加入 TCEP 溶液(与抗体摩尔比 4.4:1)，混匀，室温放置 30 分钟；向上述溶液体系加入溶解于二甲基亚砜中的 TL001 (与抗体摩尔比 9:1)，混匀，室温静置 2 小时，得到偶联后样品，分别命名为 31HZ-TL001、56HZ-TL001、74HZ-TL001 及 Enfortumab-TL001。对抗人 Nectin-4 ADC 进行缓冲液置换后分装保存在 4°C。

(2) 检测：

对抗人 Nectin-4 ADC 进行 LC-MS 分子量分析，条件如下：

色谱测定条件：

液相色谱柱：Thermo MAbPac RP 3.0×100 mm；

流动相 A：0.1% FA/98% H2O/2% ACN；

流动相 B：0.1% FA/2% H2O/98% ACN；

流速：0.25 mL/min；样品室温度：8°C；柱温：60°C；进样量：1 μL；

时间(min)	2	20	22	25	26	30
流动相A (%)	75	60	5	5	75	75
流动相B (%)	25	40	95	95	25	25

切换阀：0-3 min to waste，3-22 min to MS，22-30 min to waste

质谱测定条件：

质谱型号：AB Sciex Triple TOF 5600+；

参数：GS1 35; GS2 35; CUR 30; TEM 350; ISVF 5500; DP 200; CE 10; m/z 600-4000; Time bins to sum 40。

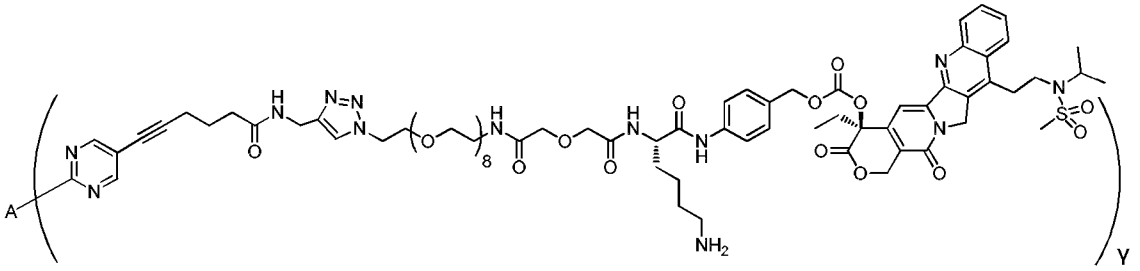
偶联后的抗人 31HZ-TL001 的轻链、重链理论分子量及实测分子量(重链以主要糖型 G0F 计算)见下表：

肽链		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	理论值(Da)	23987.65	25538.39	/	/	/
	实测值(Da)	23987.38	25539.03	/	/	/
HC	理论值(Da)	50679.13	52529.15	54078.89	55628.62	57179.37
	实测值(Da)	N/D	52529.13	54079.31	55629.57	57180.06

31HZ-TL001 轻链偶联 0~1 个毒素(LC、DAR1 比例分别为 0.1%、99.9%)、重链偶联 0~4 个毒素(HC、DAR1、DAR2、DAR3、DAR4 比例分别为 0.0%、2.0%、10.2%、86.1%、1.8%)，由此计算抗体与毒素的偶联比(DAR)为 7.75，计算公式：DAR = 轻链 DAR1 × 2+重链(DAR1 × 1+DAR2 × 2+DAR3 × 3+DAR4 × 4) × 2。

用同样的方法检测 56HZ-TL001、74HZ-TL001、Enfortumab-TL001 的 DAR 值分别为 7.71、7.98 及 8.01：

根据如上质谱的分析结果，可以确定抗人 Nectin-4 ADC 的结构为：



其中 A 为抗人 Nectin-4 人源化单克隆抗体；γ 指通过与 A 的巯基形成硫醚键而连接至 A 的 TL001 的数量，为 1-10 的整数。

将 VC-MMAE 与 Enfortumab 偶联制备 Enfortumab-VC-MMAE，制备和检测方法如上所述，抗体与 VC-MMAE 摩尔比为 1:5。最终获得该批次 Enfortumab-VC-MMAE 的 DAR 值为：5.09。

实施例 8 抗人 Nectin-4 ADC 对高表达人 Nectin-4 肿瘤细胞系的杀伤活性检测

选取 A549-Nectin-4 稳定细胞系检测 31HZ-TL001、74HZ-TL001、Enfortumab-TL001 对人 Nectin-4 高表达细胞系的杀伤活性。具体实验步骤如下：消化 A549-Nectin-4 细胞，离心收集细胞，用 DMEM+4% FBS 培养基重悬细胞至 100000/mL，100 μL/孔铺细胞至 96 孔板中；用 DMEM 基础培养基梯度稀释 ADC 分子，按照终浓度 150 μg/mL 起始，4 倍稀释，11 个浓度点，加入对应孔中，每孔 100 μL，最终血清浓度为 2%；37°C、5% CO_2 培养箱中培养 72 小时；加入 CCK8(Rhinogen)，20 μL/孔，37°C、5% CO_2 培养箱中孵育 0.5-2.5 小时，每半小时用酶标仪(MD)450 nm 读数并导入 Graphpad Prism 进行曲线拟合。

实验结果如图 9A、9B 所示，31HZ-TL001、74HZ-TL001 及 Enfortumab-TL001 均能够有效杀伤 A549-Nectin-4 细胞，其 EC_{50} 值分别为 1390 ng/mL、1364 ng/mL 及 2049 ng/mL，表明 31HZ-TL001、74HZ-TL001 对高表达人 Nectin-4 肿瘤细胞系的杀伤活性优于 Enfortumab-TL001；同时，31HZ-TL001、74HZ-TL001 及 Enfortumab-TL001 对未过表达人 Nectin-4 的 A549 细胞杀伤活性 EC_{50} 值分别为 5982 ng/mL、6251 ng/mL 及 5604 ng/mL。整体从对 A549-Nectin-4 细胞和 A549 细胞的杀伤活性来看，31HZ-TL001、74HZ-TL001 和 Enfortumab-TL001 具有 Nectin-4 靶点特异性的杀伤作用。

用上文所述相同的实验方法检测 31HZ-TL001、56HZ-TL001 对人 Nectin-4 高表达细胞系 T24-Nectin-4 的杀伤活性。实验结果如图 9C、9D 所示，31HZ-TL001、56HZ-TL001 均能够有效杀伤 T24-Nectin-4 细胞，其 EC_{50} 值分别为 1277 ng/mL、1568 ng/mL，表明两者杀伤活性基本相当；31HZ-TL001、56HZ-TL001 对未过表达人 Nectin-4 的 T24 细胞杀伤活性 EC_{50} 值分别为 2884 ng/mL、3665 ng/mL，杀伤活性明显弱于对 T24-Nectin-4 细胞的杀伤，表明两者的杀伤作用是 Nectin-4 特异性的。

实施例 9 抗人 Nectin-4 ADC 对内源表达人 Nectin-4 肿瘤细胞系的杀伤活性检测

选取 T47D 肿瘤细胞系检测 31HZ-TL001、74HZ-TL001、Enfortumab-TL001 对内源表达人 Nectin-4 肿瘤细胞系的杀伤活性。具体实验步骤如下：消化 T47D 细胞，离心收集细胞，用 1640+4%FBS 培养基重悬细胞至 100000/mL，100 μL/孔铺细胞至 96 孔板中；用 1640 基础培养基梯度稀释 ADC 分子，按照终浓度 150 μg/mL 起始，4 倍稀释，11 个浓度点，加入对应孔中，每孔 100 μL，最终血清浓度为 2%；37°C、5% CO_2

培养箱中培养 72 小时；加入 CCK8 (Rhinogen)，20 μL/孔，37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 0.5-2.5 小时，每半小时用酶标仪(MD) 450 nm 读数并导入 Graphpad Prism 进行曲线拟合。

实验结果如图 10A 所示，31HZ-TL001、74HZ-TL001 及 Enfortumab-TL001 均能够有效杀伤 T47D 细胞，其 EC_{50} 值分别为 206.1 ng/mL、611.3 ng/mL 及 229.2 ng/mL，表明 31HZ-TL001 对 T47D 细胞的杀伤活性与 Enfortumab-TL001 相当。

用上文所述相同的实验方法检测 31HZ-TL001、74HZ-TL001 及 Enfortumab-TL001 对内源表达人 Nectin-4 肿瘤细胞系 MDA-MB-468 的杀伤活性。实验结果如图 10B 所示，31HZ-TL001、74HZ-TL001 及 Enfortumab-TL001 均能够有效杀伤 MDA-MB-468 细胞，其 EC_{50} 值分别为 1030 ng/mL、2277 ng/mL 及 1190 ng/mL，表明 31HZ-TL001 对 MDA-MB-468 细胞的杀伤活性与 Enfortumab-TL001 相当。

用上文所述相同的实验方法检测 31HZ-TL001、56HZ-TL001 对内源表达人 Nectin-4 肿瘤细胞系 NCI-N87 的杀伤活性。实验结果如图 10C 所示，31HZ-TL001、56HZ-TL001 均能够有效杀伤 NCI-N87 细胞，其 EC_{50} 值分别为 9376 ng/mL、10935 ng/mL，表明两者杀伤活性基本相当。

综上所述，31HZ-TL001、56HZ-TL001 对内源表达人 Nectin-4 肿瘤细胞系的杀伤活性与 Enfortumab-TL001 基本相当。

实施例 10 抗人 Nectin-4 ADC 体内 CDX 模型药效检测

通过人非小细胞肺癌细胞系 NCI-H322M 构建 CDX 模型评价 ADC 分子的抗肿瘤作用。具体步骤如下：用含 10%胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 培养液，在 37℃，5% CO_2 的条件下培养 NCI-H322M 细胞。收集指数生长期细胞，PBS 重悬，按照 1× 10^7/只的细胞量(悬浮于 0.1 mL PBS)，皮下接种于雌性 NOD/SCID 小鼠(百奥赛图江苏基因生物技术有限公司)，建立皮下移植瘤模型。待肿瘤平均体积达到 70~100 mm^3 时，根据瘤体积随机分组，每组 5 只。分组当天记为第 0 天(Day 0)，组别为媒介物(生理盐水)(阴性对照)组、31HZ-TL001 组(3 mg/kg 和 10 mg/kg)、56HZ-TL001 组(3 mg/kg 和 10 mg/kg)、Enfortumab-TL001 组(10 mg/kg)及 Enfortumab-VC-MMAE 组(10 mg/kg)。所有样品均为尾静脉注射，每周给药 2 次，共给药 6 次。

给药后每周 2 次用游标卡尺测量肿瘤直径，并按如下计算公式计算肿瘤体积：$V = 0.5\ a \times b^2$，其中 a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。每天观察记录动物死亡情况。

采用以下公式计算肿瘤生长抑制率 TGI (%)，用于评价抑瘤疗效：

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

其中 $V_{T末}$：处理组实验结束时肿瘤体积均值；

$V_{T始}$：处理组给药开始时肿瘤体积均值；

$V_{C末}$：阴性对照组实验结束时肿瘤体积均值；

$V_{C始}$：阴性对照组给药开始时肿瘤体积均值。

实验结果如表 9 及图 11、12 所示，31HZ-TL001、56HZ-TL001、Enfortumab-TL001 及 Enfortumab-VC-MMAE 对 NCI-H322M 移植瘤模型的肿瘤生长有显著的抑制作用，且呈剂量依赖性。6 次给药后(第 21 天)，与阴性对照组相比，在 10 mg/kg 剂量水平下，31HZ-TL001、56HZ-TL001、Enfortumab-TL001 和 Enfortumab-VC-MMAE 的 TGI 分别为 155.79%、163.56%、156.31%和 173.79%。所有治疗组小鼠在观察期内均无明显的体重下降，表明动物对 ADC 药物的耐受性良好。

表 9 NCI-H322M + NOD/SCID 小鼠 CDX 模型

组别	剂量 (mg/kg)	第 21 天 肿瘤体积(mm^3) ($\bar{x}$±SEM)	TGI (%)	肿瘤消退 (PR/CR)	P 值
媒介物	10	347.06±25.84	/	(0/0)	/
31HZ-TL001	3	119.96±32.99	90.61	(1/0)	＜0.001
31HZ-TL001	10	42.92±3.00	155.79	(5/0)	＜0.001
56HZ-TL001	3	100.12±25.64	98.33	(4/0)	＜0.001
56HZ-TL001	10	35.53±2.12	163.56	(5/0)	＜0.001
Enfortumab-TL001	10	42.62±5.38	156.31	(5/0)	＜0.001
Enfortumab-VC-MMAE	10	25.47±4.70	173.79	(5/0)	＜0.001

注：TGI：肿瘤生长抑制率；PR：肿瘤部分消退；CR：肿瘤全部消退。P 值为与媒介物组比较结果。

上述结果表明，从 31HZ-TL001、56HZ-TL001 在 3 mg/kg 和 10 mg/kg 剂量水平下的 TGI 来看，31HZ-TL001 和 56HZ-TL001 均能剂量依赖性地有效抑制肿瘤生长。在 10 mg/kg 剂量水平下，31HZ-TL001 和 56HZ-TL001 均能使组中 5 只小鼠产生肿瘤部分消退，并且与 Enfortumab-TL001 及 Enfortumab-VC-MMAE 药效基本相当。此外，荷瘤小鼠对 31HZ-TL001、56HZ-TL001 具有良好的耐受性。

实施例 11 抗人 Nectin-4 ADC 体内 PDX 模型药效检测

从 HuPrime®膀胱癌异种移植模型 BL9200 (中美冠科生物技术(太仓)有限公司，高表达 Nectin-4 的膀胱癌肿瘤，来源于一名 63 岁男性患者)荷瘤小鼠收取肿瘤组织，切

成直径为 3×3×3 mm 的瘤块接种于 NOD/SCID 小鼠(江苏集萃药康生物科技有限公司)右前肩胛处皮下。当荷瘤鼠平均肿瘤体积到达约 150-250 mm^3 时，根据肿瘤大小随机分组，每组 7 只，分组当天定义为第 0 天(Day 0)。组别为 4 组：Human IgG1 同型对照抗体(阴性对照)组(IgG1 3 mg/kg)、Human IgG1-TL001 (简称 IgG1-TL001，3 mg/kg；制备方法参见实施例 7)、56HZ-TL001 1 mg/kg 组和 3 mg/kg 组。所有样品均为尾静脉注射，每周 2 次，共给药 6 次。给药后观察并定期测量小鼠肿瘤体积及体重，测量和计算方法如实施例 10 所述。

实验结果如表 10 及图 13、14 所示，6 次给药后(第 20 天)，与阴性对照组 Human IgG1 (hIgG1) 3 mg/kg 相比，56HZ-TL001 3 mg/kg 对肿瘤生长的抑制 TGI 为 105.55% ($p < 0.05$)，且该组有 4 只小鼠肿瘤部分消退；56HZ-TL001 3mg/kg 对肿瘤的生长抑制作用显著优于相同剂量的同型对照 ADC (hIgG1-TL001 3 mg/kg) ($p < 0.001$)。hIgG1 组 1 只小鼠死亡，其余组别无动物死亡，且活动正常。给药期间各组小鼠体重均有轻微下降，其中 IgG1 组的体重由于未得到有效治疗而下降程度最大，表明荷瘤鼠对 ADC 药物的耐受性良好。

上述结果表明，56HZ-TL001 对 BL9200 膀胱癌 PDX 移植瘤模型的肿瘤生长具有显著的抑制作用。此外，荷瘤鼠对 56HZ-TL001 耐受性良好。

表 10 HuPrime®膀胱癌 + NOD/SCID 小鼠 PDX 模型

组别	剂量 (mg/kg)	第 20 天				
		肿瘤体积 (mm^3) ($\bar{x}$±SEM)	TGI (%)	肿瘤消退 (PR/CR)	*P* 值(相对 hIgG1)	*P* 值(相对 hIgG1-TL001)
hIgG1	3	1379.58±221.96	/	0/0	/	/
hIgG1-TL001	3	926.31±163.85	37.47	0/0	＞0.05	/
56HZ-TL001	3	101.71±16.78	105.55	4/0	＜0.001	＜0.001

注：TGI：肿瘤生长抑制率；PR：肿瘤部分消退；CR：肿瘤全部消退；/：不适用。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，但本领域技术人员将理解：根据已经公布的所有教导，可以对细节进行各种修改和变动，并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

序列表

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列

1	31# VH	EVQLQQPGADLVRPGASVKLSCKASGYTFTDY WMNWVKLRPGQGLEWIGMIHPSDSETRLNQK FKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYC ARWDFRIYYAMDYWGQGTSVTVSS
2	31# VL	DVVITQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNTN SQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRESGVP DRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHY STPLTFGAGTKLEIK
3	Chothia 31#/31HZ CDR-H1	GYTFTDY
4	Chothia 31#/31HZ CDR-H2	HPSDSE
5	Chothia/Abm/ Kabat 31#/31HZ CDR-H3	WDFRIYYAMDY
6	Chothia/Abm/ Kabat 31#/31HZ CDR-L1	KSSQSLLNTNSQKNYLA
7	Chothia/Abm/ Kabat 31#/31HZ CDR-L2	FASTRES
8	Chothia/Abm/ Kabat/IMGT 31#/31HZ/74#/74HZ CDR-L3	QQHYSTPLT
9	Abm 31#/31HZ CDR-H1	GYTFTDYWMN
10	Abm 31#/31HZ CDR-H2	MIHPSDSETR
11	Kabat 31#/31HZ CDR-H1	DYWMN
12	Kabat 31# CDR-H2	MIHPSDSETRLNQKFKD
13	IMGT 31#/31HZ CDR-H1	GYTFTDYW
14	IMGT 31#/31HZ CDR-H2	IHPSDSET
15	IMGT 31# /31HZ CDR-H3	ARWDFRIYYAMDY
16	IMGT 31# /31HZ CDR-L1	QSLLNTNSQKNY
17	IMGT 31#/31HZ CDR-L2	FAS
18	Chothia 56HZ CDR-H1	GYFNSITSDY

19	56# VH	QVQLKESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDY DWHWIRHFPGNMLEWMGYISFSGRTYYNPSLK SRISITHDTSKNHFFLRLNSVTTEDTATYYCARG NYDGFDYWGQGTTLTVSS
20	56# VL	DIQLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQNIGTSIHW YQHRTNGSPRLLIKFASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQSKSWPTYTFGGGT KLEIK
21	Chothia 56# CDR-H1	GYSITSDY
22	Chothia 56#/56HZ CDR-H2	SFSGR
23	Chothia/Abm/ Kabat 56#/56HZ CDR-H3	GNYDGFDY
24	Chothia/Abm/ Kabat 56# /56HZ CDR-L1	RASQNIGTSIH
25	Chothia/Abm/ Kabat 56#/56HZ CDR-L2	FASESIS
26	Chothia/Abm/ Kabat/IMGT 56#/56HZ CDR-L3	QQSKSWPTYT
27	Abm 56# CDR-H1	GYSITSDYDWH
28	Abm 56#/56HZ CDR-H2	YISFSGRTY
29	Kabat 56# CDR-H1	SDYDWH
30	Kabat 56#/56HZ CDR-H2	YISFSGRTYYNPSLKS
31	IMGT 56# CDR-H1	GYSITSDYD
32	IMGT 56#/56HZ CDR-H2	ISFSGRT
33	IMGT 56#/56HZ CDR-H3	ARGNYDGFDY
34	IMGT 56#/56HZ CDR-L1	QNIGTS
35	IMGT 56#/56HZ CDR-L2	FAS
36	Abm 56HZ CDR-H1	GYFNSITSDYDWH

37	74# VH	EVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFINY WMNWVKQRPGQGLEWIGMIHPSDSATRLNQK FKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYC ARWGNFYTVNAWYYFDYWGHGTTLTVSS
38	74# VL	DIVITQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQTLLNSN TQKNYLAWYQQKPGQSPKLLFYFASTRESGVP DRFIGSGSGTNFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYS TPLTFGAGTKLEIK
39	Chothia 74#/74HZ CDR-H1	GYTFINY
40	Chothia 74#/74HZ CDR-H2	HPSDSA
41	Chothia/Abm/ Kabat 74#/74HZ CDR-H3	WGNFYTVNAWYYFDY
42	Chothia/Abm/ Kabat 74#/74HZ CDR-L1	KSSQTLLNSNTQKNYLA
43	Chothia/Abm/ Kabat 74#/74HZ CDR-L2	FASTRES
44	Kabat 56HZ CDR-H1	ITSDYDWH
45	Abm 74#/74HZ CDR-H1	GYTFINYWMN
46	Abm 74#/74HZ CDR-H2	MIHPSDSATR
47	Kabat 74#/74HZ CDR-H1	NYWMN
48	Kabat 74#CDR-H2	MIHPSDSATRLNQKFKD
49	IMGT 74#/74HZ CDR-H1	GYTFINYW
50	IMGT 74#/74HZ CDR-H2	IHPSDSAT
51	IMGT 74#/74HZ CDR-H3	ARWGNFYTVNAWYYFDY
52	IMGT 74#/74HZ CDR-L1	QTLLNSNTQKNY
53	IMGT 74#/74HZ CDR-L2	FAS
54	IMGT 56HZ CDR-H1	GYFNSITSDYD
55	31HZ VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDY WMNWVRLAPGQGLEWIGMIHPSDSETRLNQK FQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARWDFRIYYAMDYWGQGTLVTVSS

56	31HZ VL	DVVITQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNTNS QKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYST PLTFGGGTKVEIK
57	56 HZ VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYFNSITSD YDWHWIRHHPGKGLEWMGYISFSGRTYYNPSL KSRVTISHDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA RGNYDGFDYWGQGTLVTVSS
58	56HZ VL	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNIGTSIHW YQHKPGQSPRLLIKFASESISGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKSWPTYTFGGGTK VEIK
59	74HZ VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFINY WMNWVRQAPGQGLEWIGMIHPSDSATRLNQSF QGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RWGNFYTVNAWYYFDYWGQGTLVTVSS
60	74HZ VL	DIVITQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTLLNSNTQ KNYLAWYQQKPGQSPKLLFYFASTRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYSTP LTFGQGTKLEIK
61	IgG1 重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
62	Kappa 轻链恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
63	Kabat 31HZ CDR-H2	MIHPSDSETRLNQKFQG
64	Kabat 74HZ CDR-H2	MIHPSDSATRLNQSFQG

权 利 要 求 书

1. 特异性结合 Nectin-4 的抗体或其抗原结合片段，其包含：

(1a)

如下三个根据 Chothia 编号系统定义的重链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 3 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 4 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或

如下三个根据 Chothia 编号系统定义的轻链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(1b)

如下三个根据 Abm 编号系统定义的重链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 9 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 10 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或

如下三个根据 Abm 编号系统定义的轻链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(1c)

如下三个根据 Kabat 编号系统定义的重链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 11 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 12 或 63 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或

如下三个根据 Kabat 编号系统定义的轻链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(1d)

如下三个根据 IMGT 编号系统定义的重链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 13 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 14 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 15 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或

如下三个根据 IMGT 编号系统定义的轻链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 16 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 17 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(2a)

如下三个根据 Chothia 编号系统定义的重链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 21 或 18 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 22 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或

如下三个根据 Chothia 编号系统定义的轻链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(2b)

如下三个根据 Abm 编号系统定义的重链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 27 或 36 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 28 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或

如下三个根据 Abm 编号系统定义的轻链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(2c)

如下三个根据 Kabat 编号系统定义的重链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 29 或 44 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 30 所示序列或其变体的 CDR-H2，
包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或
如下三个根据 Kabat 编号系统定义的轻链 CDRs：
包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，
包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，
包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；
或者
(2d)
如下三个根据 IMGT 编号系统定义的重链 CDRs：
包含 SEQ ID NO: 31 或 54 所示序列或其变体的 CDR-H1，
包含 SEQ ID NO: 32 所示序列或其变体的 CDR-H2，
包含 SEQ ID NO: 33 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或
如下三个根据 IMGT 编号系统定义的轻链 CDRs：
包含 SEQ ID NO: 34 所示序列或其变体的 CDR-L1，
包含 SEQ ID NO: 35 所示序列或其变体的 CDR-L2，
包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；
或者
(3a)
如下三个根据 Chothia 编号系统定义的重链 CDRs：
包含 SEQ ID NO: 39 所示序列或其变体的 CDR-H1，
包含 SEQ ID NO: 40 所示序列或其变体的 CDR-H2，
包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或
如下三个根据 Chothia 编号系统定义的轻链 CDRs：
包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，
包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，
包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；
或者
(3b)
如下三个根据 Abm 编号系统定义的重链 CDRs：
包含 SEQ ID NO: 45 所示序列或其变体的 CDR-H1，
包含 SEQ ID NO: 46 所示序列或其变体的 CDR-H2，
包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或
如下三个根据 Abm 编号系统定义的轻链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(3c)

如下三个根据 Kabat 编号系统定义的重链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 47 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 48 或 64 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或

如下三个根据 Kabat 编号系统定义的轻链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

或者

(3d)

如下三个根据 IMGT 编号系统定义的重链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 49 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 50 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 51 所示序列或其变体的 CDR-H3；和/或

如下三个根据 IMGT 编号系统定义的轻链 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 52 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 53 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)；优选地，所述置换是保守置换；

优选地，所述抗体或抗原结合片段还包含衍生自人或鼠免疫球蛋白的框架区；

优选地，所述抗体或抗原结合片段结合人 Nectin-4。

2. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段，其包含：

(a) 如下六个根据 Chothia 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 3 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 4 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3，

包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或者

(b) 如下六个根据 Abm 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 9 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 10 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3，

包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或者

(c) 如下六个根据 Kabat 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 11 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 12 或 63 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 5 所示序列或其变体的 CDR-H3，

包含 SEQ ID NO: 6 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 7 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或者

(d) 如下六个根据 IMGT 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 13 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 14 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 15 所示序列或其变体的 CDR-H3，

包含 SEQ ID NO: 16 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 17 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)；优选地，所述置换是保守置换。

3. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段，其包含：

(a) 如下六个根据 Chothia 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 21 或 18 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 22 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3，

包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；或者

(b) 如下六个根据 Abm 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 27 或 36 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 28 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3，

包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；或者

(c) 如下六个根据 Kabat 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 29 或 44 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 30 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 23 所示序列或其变体的 CDR-H3，

包含 SEQ ID NO: 24 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；或者

(d) 如下六个根据 IMGT 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 31 或 54 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 32 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 33 所示序列或其变体的 CDR-H3，

包含 SEQ ID NO: 34 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 35 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 26 所示序列或其变体的 CDR-L3；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)；优选地，所述置换是保守置换。

4. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段，其包含：

(a) 如下六个根据 Chothia 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 39 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 40 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3，

包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 或其变体的 CDR-L3；或者

(b) 如下六个根据 Abm 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 45 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 46 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3，

包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或者

(c) 如下六个根据 Kabat 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 47 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 48 或 64 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 41 所示序列或其变体的 CDR-H3，

包含 SEQ ID NO: 42 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 43 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；或者

(d) 如下六个根据 IMGT 编号系统定义的重链和轻链的 CDRs：

包含 SEQ ID NO: 49 所示序列或其变体的 CDR-H1，

包含 SEQ ID NO: 50 所示序列或其变体的 CDR-H2，

包含 SEQ ID NO: 51 所示序列或其变体的 CDR-H3，

包含 SEQ ID NO: 52 所示序列或其变体的 CDR-L1，

包含 SEQ ID NO: 53 所示序列或其变体的 CDR-L2，

包含 SEQ ID NO: 8 所示序列或其变体的 CDR-L3；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)；优选地，所述置换是保守置换。

5. 权利要求 1-4 任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含：

具有如 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 55 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 56 所示序列或其变体的 VL；或

具有如 SEQ ID NO: 19 或 SEQ ID NO: 57 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 58 所示序列或其变体的 VL；或

具有如 SEQ ID NO: 37 或 SEQ ID NO: 59 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 60 所示序列或其变体的 VL；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、

至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%的序列同一性，或者与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)；优选地，所述置换是保守置换。

6. 权利要求 1-5 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含：

(1) 具有如 SEQ ID NO: 1 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 2 所示序列或其变体的 VL；或者

(2) 具有如 SEQ ID NO: 19 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 20 所示序列或其变体的 VL；或者

(3) 具有如 SEQ ID NO: 37 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 38 所示序列或其变体的 VL；或者

(4) 具有如 SEQ ID NO: 55 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 56 所示序列或其变体的 VL；或者

(5) 具有如 SEQ ID NO: 57 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 58 所示序列或其变体的 VL；或者

(6) 具有如 SEQ ID NO: 59 所示序列或其变体的 VH 和/或具有如 SEQ ID NO: 60 所示序列或其变体的 VL；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%的序列同一性，或者与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)；优选地，所述置换是保守置换。

7. 权利要求 1-6 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

8. 权利要求 1-7 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其进一步包含：

人免疫球蛋白的重链恒定区或其变体，以及轻链恒定区或其变体，其中所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如，至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)；

优选地，所述重链恒定区为 IgG 重链恒定区，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区；所述轻链恒定区选自 κ 或 λ 轻链恒定区；

更优选地，所述重链恒定区为 IgG1 重链恒定区；

最优选地，所述重链恒定区具有如 SEQ ID NO: 61 所示的序列；所述轻链恒定

区为κ轻链恒定区；和/或所述轻链恒定区具有如 SEQ ID NO: 62 所示的序列。

9. 权利要求 1-8 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含重链和轻链，其中：

(a) 所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 1 所示序列的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 2 所示序列的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列的轻链恒定区；或者

(b) 所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 19 所示序列的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 20 所示序列的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列的轻链恒定区；或者

(c) 所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 37 所示序列的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 38 所示序列的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列的轻链恒定区；或者

(d) 所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 55 所示序列的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 56 所示序列的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列的轻链恒定区；或者

(e) 所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 57 所示序列的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 58 所示序列的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列的轻链恒定区；或者

(f) 所述重链包含：具有 SEQ ID NO: 59 所示序列的 VH 和具有 SEQ ID NO: 61 所示序列的重链恒定区，所述轻链包含：具有 SEQ ID NO: 60 所示序列的 VL 和具有 SEQ ID NO: 62 所示序列的轻链恒定区。

10. 权利要求 1-9 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其选自 scFv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv 片段、二硫键稳定的 Fv (dsFv)、双抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。

11. 权利要求 1-10 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其结合 Nectin-4 的 IgV 结构域。

12. 权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其与至少一种标记缀合；优选地，所述标记选自酶、荧光染料、放射性同位素、生物素和胶体金。

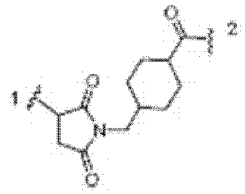
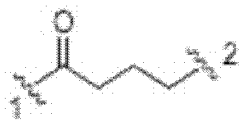
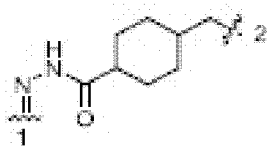
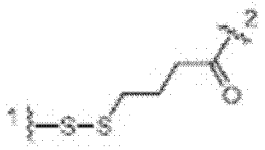
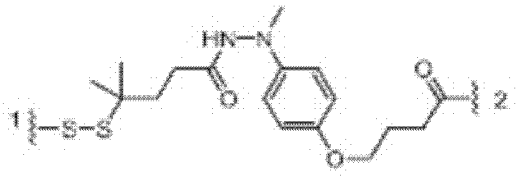
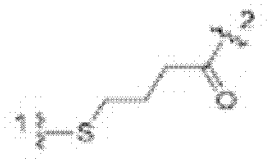
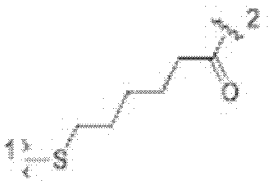
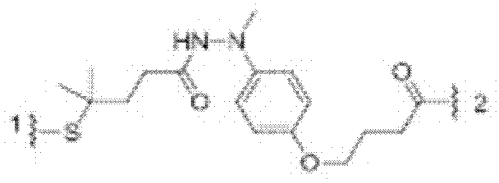
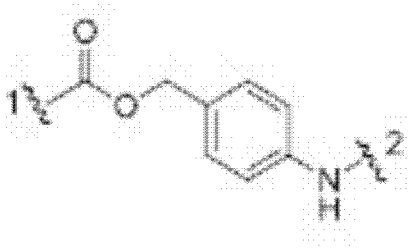
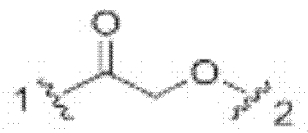
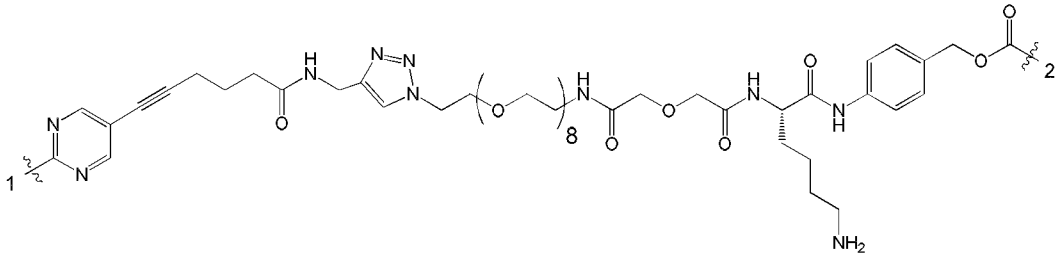
13. 一种抗体缀合物，其包含权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段以及至少一种治疗剂。

14. 权利要求 13 的抗体缀合物，其中所述治疗剂为细胞毒性剂。

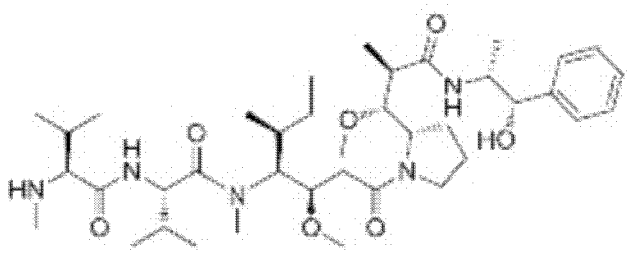
15. 权利要求 13 或 14 的抗体缀合物，其具有式(I)所示结构，

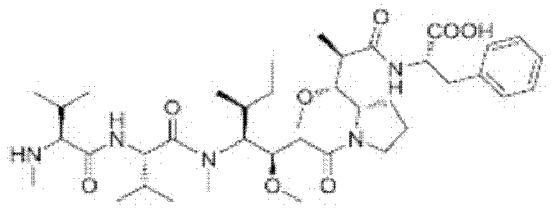
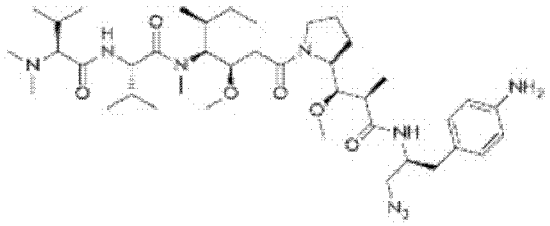
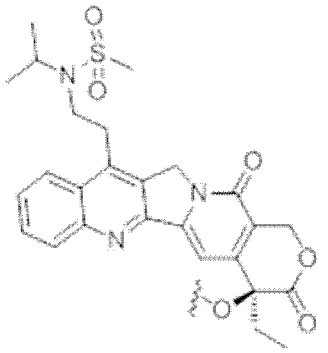
$$A\text{-}(L\text{-}D)_\gamma \quad (I);$$

其中，A 为如权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段；

L 包含氨基酸或 2-10 个氨基酸组成的肽；进一步优选地，L 选自 Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、、、、、、、、、、或，其中 1 和 2 中的一个表示 L 与 A 连接的位置，另一个表示 L 与 D 连接的位置；

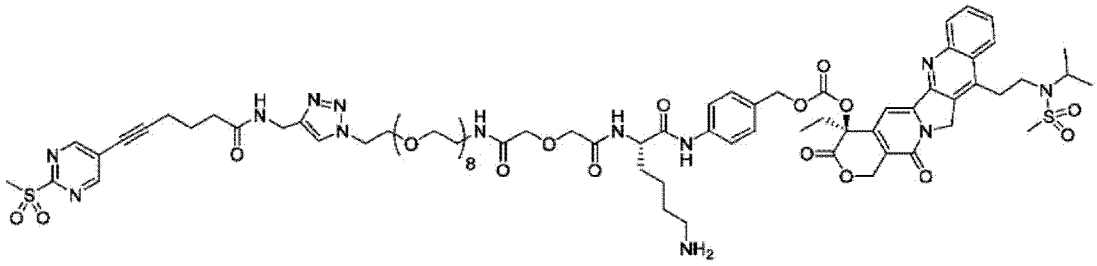
D 选自细胞毒性剂、治疗性抗体、放射性同位素、寡核苷酸及其类似物、生物活性肽、蛋白毒素和酶；优选地，D 为具有抗肿瘤生物活性的分子；

进一步优选地，D 为、


、


或 ；

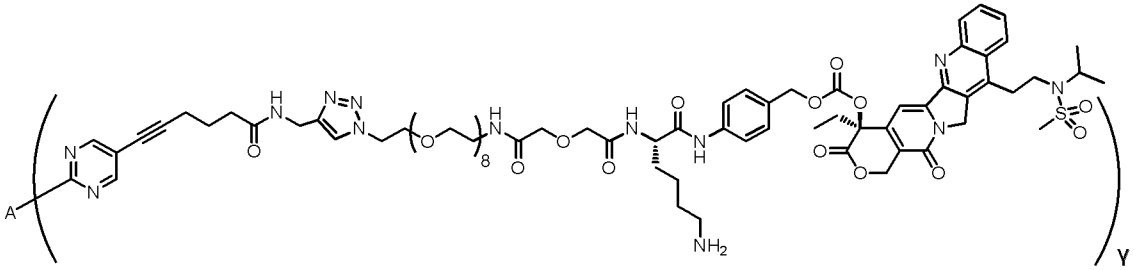
γ 为 1-10 的整数。

16. 权利要求 15 的抗体缀合物，其中(L-D)部分具有式(1)的结构，其通过与 A 上的巯基形成硫醚键而连接，



式(1)，

所述抗体缀合物具有式(2)的结构：



式(2)，

其中 γ 为 1~10 的整数，A 为权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段。

17. 权利要求 13 的抗体缀合物，其中所述治疗剂为放射性同位素；

优选地，所述放射性同位素选自 ^{212}Bi、^{213}Bi、^{131}I、^{125}I、^{111}In、^{177}Lu 、^{186}Re、^{188}Re、^{153}Sm、^{90}Y。

18. 一种组合物，其含有权利要求 13-17 中任一项的抗体缀合物，其中组合物中治疗剂与所述抗体或其抗原结合片段的摩尔比(DAR 值)为 1-10 之间的小数或整数(例如

1-8 之间的小数或整数，例如 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.79、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、6.95、7.0、7.03、7.1、7.12、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 或 8.0)。

19. 一种嵌合抗原受体(CAR)，其包含权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段，跨膜结构域、以及一个或多个细胞内 T 细胞信号结构域。

20. 一种免疫效应细胞，其在表面表达权利要求 19 所述的 CAR；优选地，所述免疫效应细胞选自细胞毒性 T 细胞、自然杀伤细胞和自然杀伤 T 细胞。

21. 一种核酸分子，其编码权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段。

22. 一种表达载体，其包含权利要求 21 的核酸分子。

23. 一种宿主细胞，其包含权利要求 21 的核酸分子或权利要求 24 的表达载体；

优选地，所述宿主细胞为真核细胞；更优选为哺乳动物细胞；最优选为中国仓鼠卵巢细胞；或者

优选地，所述宿主细胞为原核细胞；更优选地，所述宿主细胞为大肠杆菌。

24. 一种多特异性抗体，其包含权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段以及至少一种其他抗体或其抗原结合片段或者抗体类似物，使得所述多特异性抗体能够结合 Nectin-4 以及至少一种其他抗原；优选地，所述多特异性抗体为双特异性抗体或三特异性抗体或四特异性抗体。

25. 一种融合蛋白，其包含权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段，以及另外的生物活性多肽；

优选地，所述另外的生物活性多肽是具有治疗活性、结合活性或酶活性的多肽或蛋白。

26. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段、权利要求 13-17 中任一项的抗体缀合物、权利要求 18 的组合物、权利要求 20 的免疫效应细胞、权利要求 24 的多特异性抗体或权利要求 25 的融合蛋白，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

27. 权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段、权利要求 13-17 中任一项的抗体缀合物、权利要求 18 的组合物、权利要求 20 的免疫效应细胞、权利要求 24 的多特异性抗体、权利要求 25 的融合蛋白或权利要求 26 的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗癌症；优选地，所述癌症选自胃癌、肝癌、肝细胞癌、膀胱癌、尿路上皮癌、尿道癌、肾盂癌、输尿管癌、肺癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、乳腺导管癌、三阴性乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、结肠癌、直肠癌和食管癌。

28. 权利要求 27 的用途，其中所述药物与选自以下的一种或多种治疗剂联合使用：抗肿瘤药物、化疗剂、放射性同位素、免疫检查点抑制剂。

29. 权利要求 27 的用途，其中所述药物与选自以下的一种或多种治疗方案联合使用：手术、放疗、化疗、靶向治疗、免疫治疗、激素治疗、血管生成抑制和姑息治疗。

30. 一种检测样品中 Nectin-4 的存在或确定其表达水平的方法，其包括：

(a) 使所述样品与权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段接触，和

(b) 检测所述抗体或抗原结合片段与所述样品中Nectin-4之间免疫复合物的形成或确定所述免疫复合物的量，以检测样品中 Nectin-4 的存在或确定样品中 Nectin-4 的表达水平。

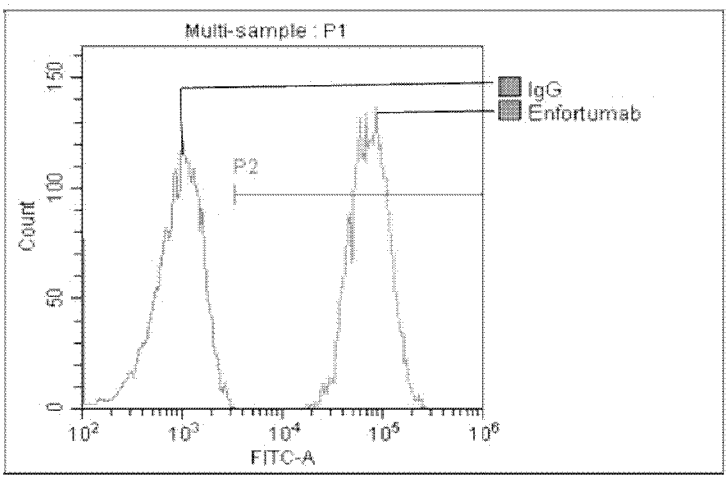

Multi-sample : P1
IgG
Enfortumab
P2
Count
FITC-A

图 1A

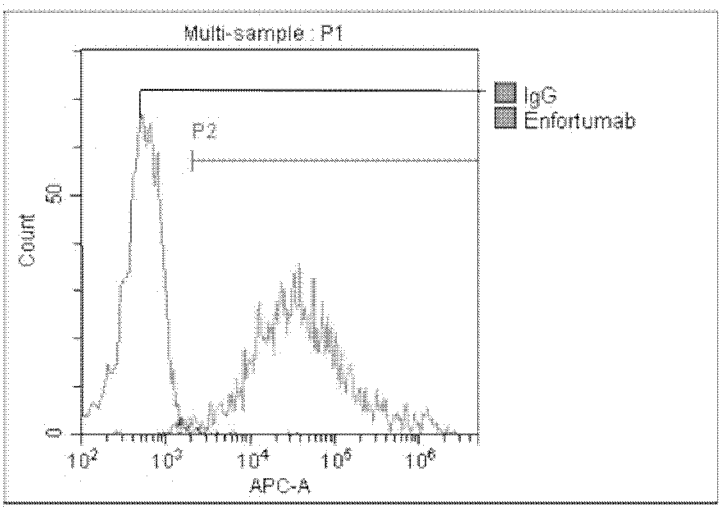

Multi-sample : P1
IgG
Enfortumab
P2
Count
APC-A

图 1B

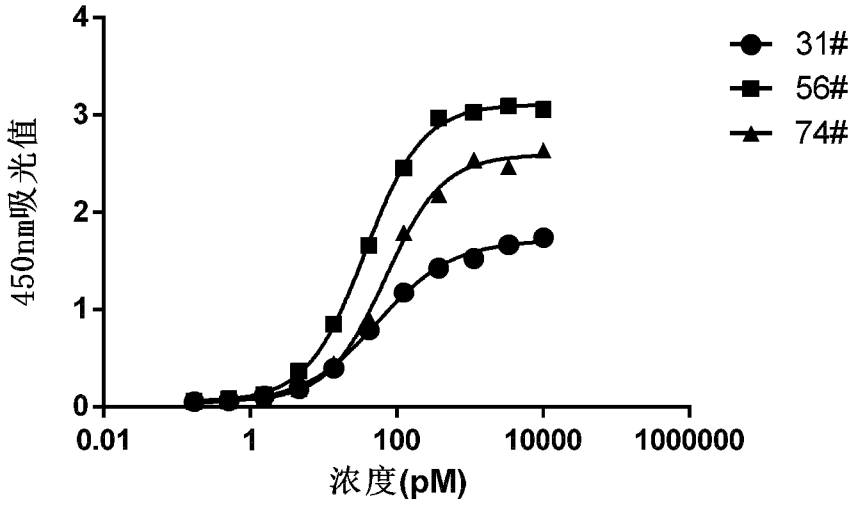

31#
56#
74#
450nm吸光值
浓度(pM)

图 2

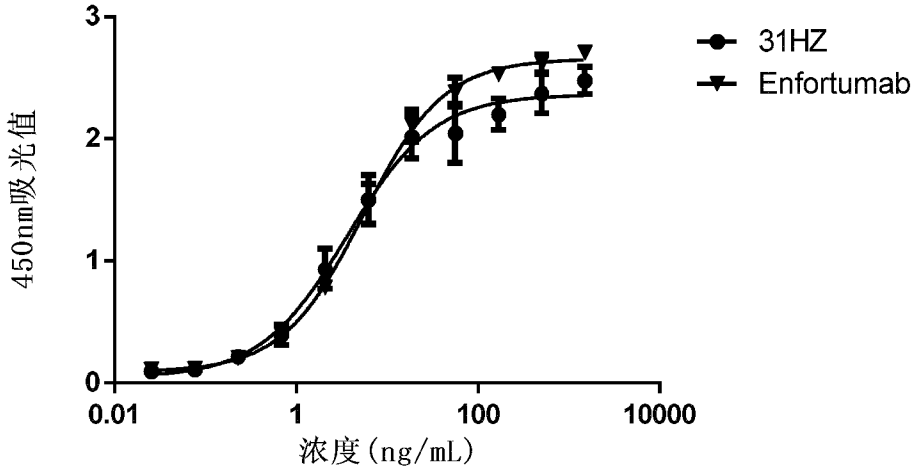

3
2
1
0
450nm吸光值
0.01
1
100
10000
浓度(ng/mL)
31HZ
Enfortumab

图 3A

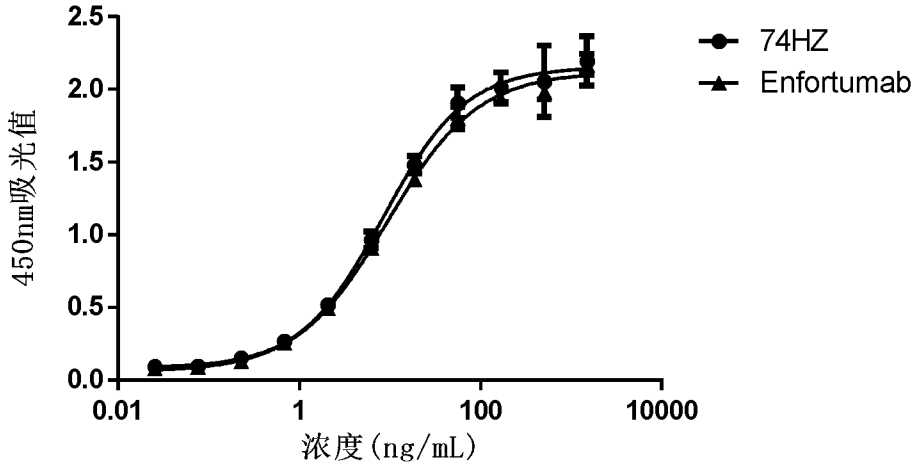

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
450nm吸光值
0.01
1
100
10000
浓度(ng/mL)
74HZ
Enfortumab

图 3B

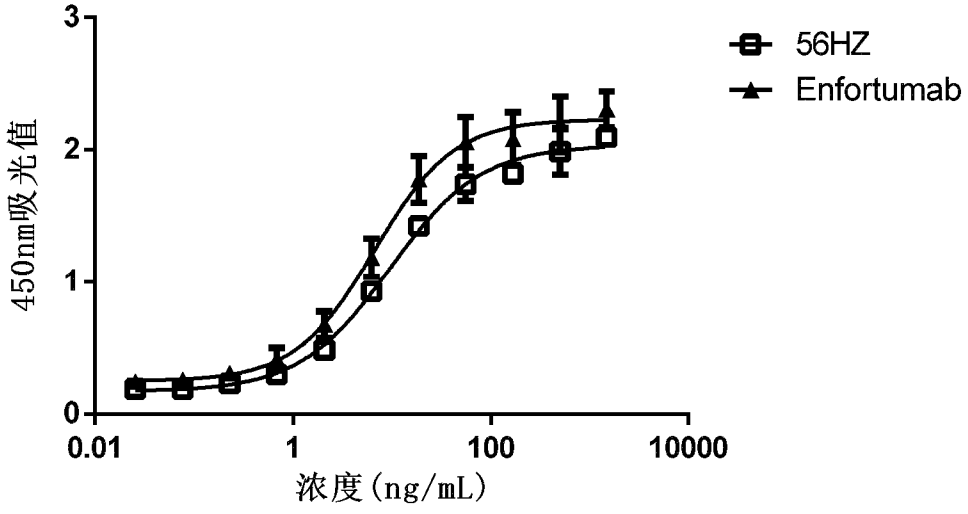

3
2
1
0
450nm吸光值
0.01
1
100
10000
浓度(ng/mL)
56HZ
Enfortumab

图 3C

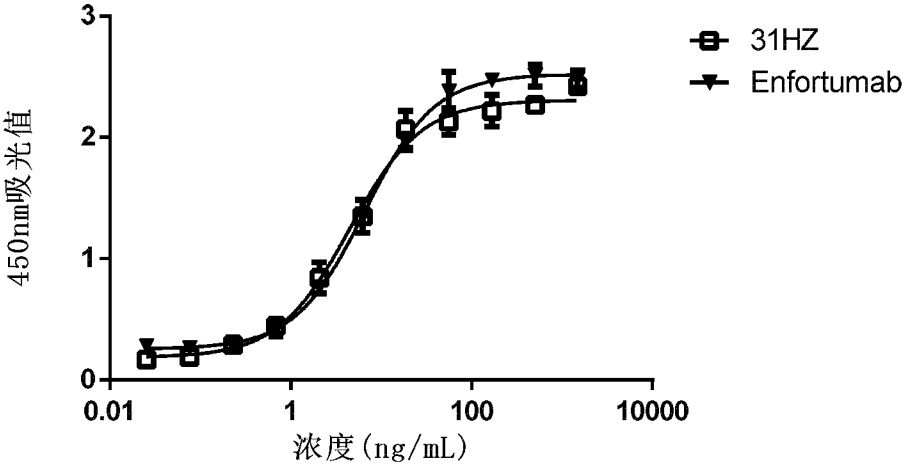

31HZ
Enfortumab
450nm吸光值
浓度(ng/mL)
0
1
2
3
0.01
1
100
10000

图 3D

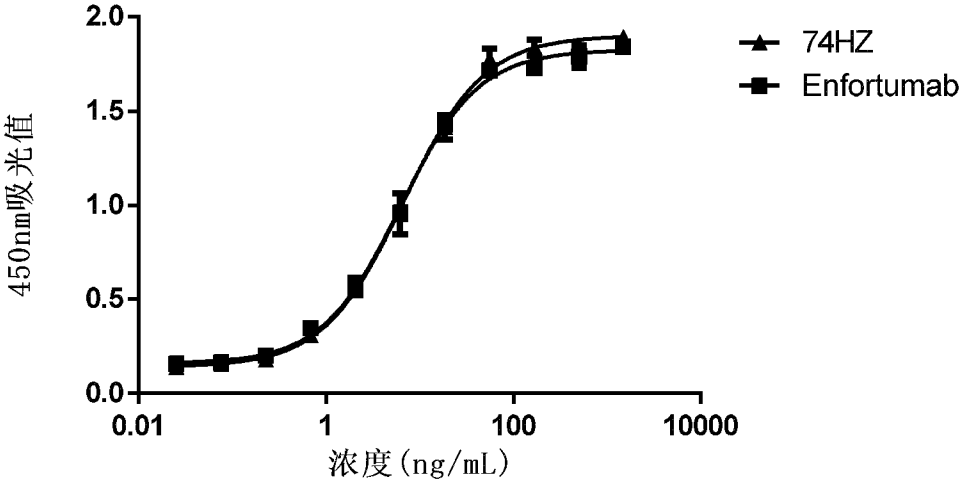

74HZ
Enfortumab
450nm吸光值
浓度(ng/mL)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0.01
1
100
10000

图 3E

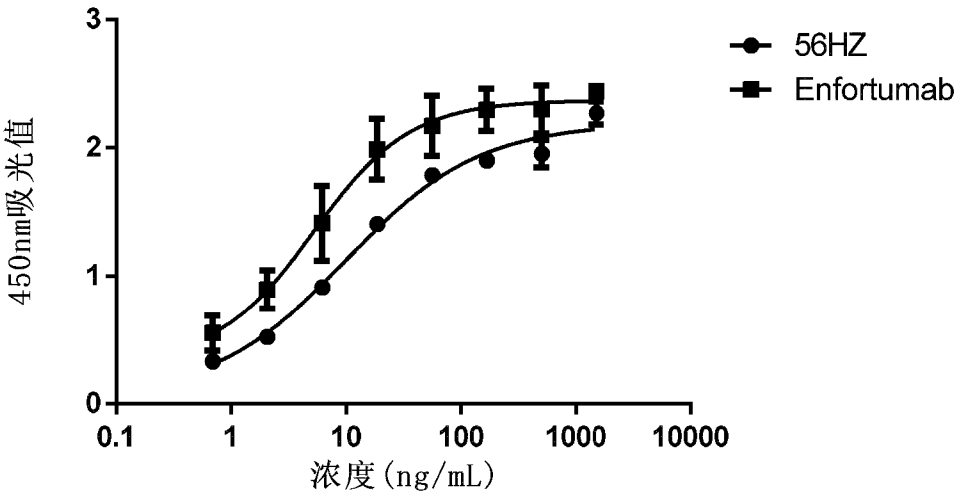

56HZ
Enfortumab
450nm吸光值
浓度(ng/mL)
0
1
2
3
0.1
1
10
100
1000
10000

图 3F

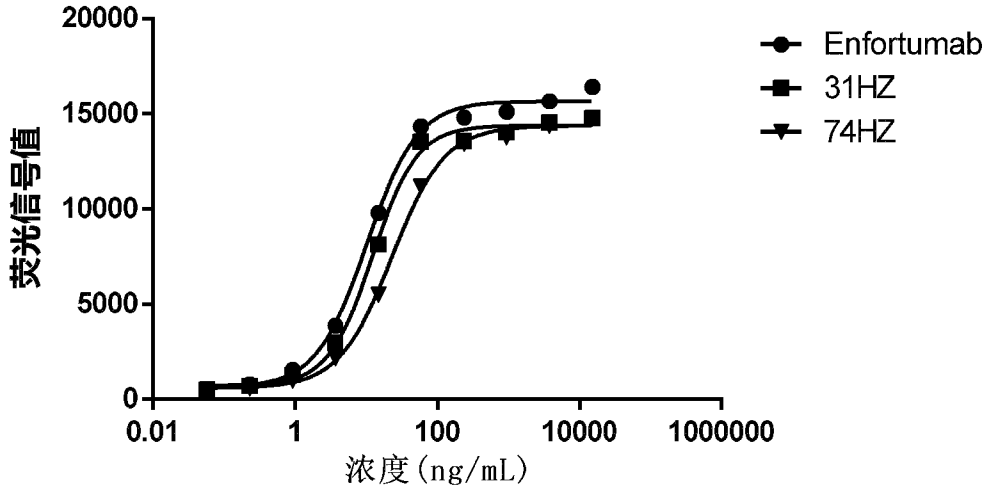

20000
15000
10000
5000
0
荧光信号值
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(ng/mL)
Enfortumab
31HZ
74HZ

图 4A

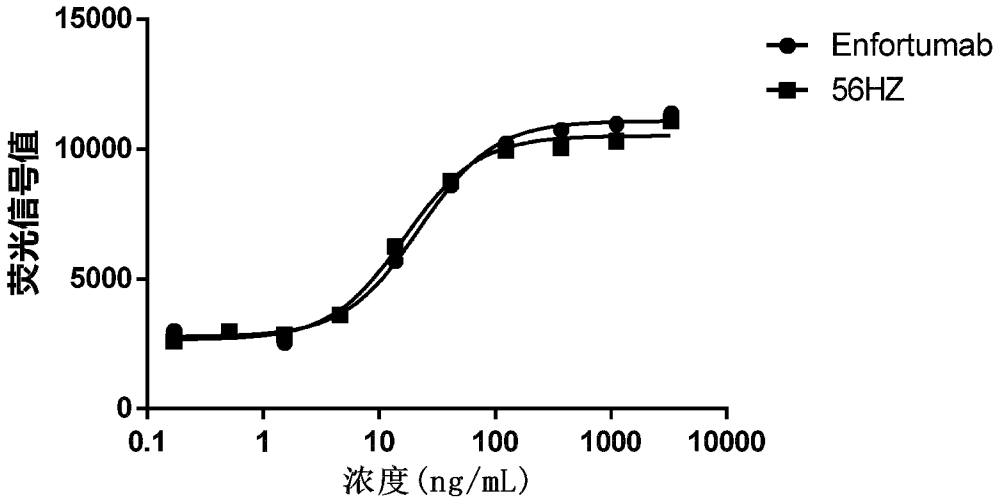

15000
10000
5000
0
荧光信号值
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度(ng/mL)
Enfortumab
56HZ

图 4B

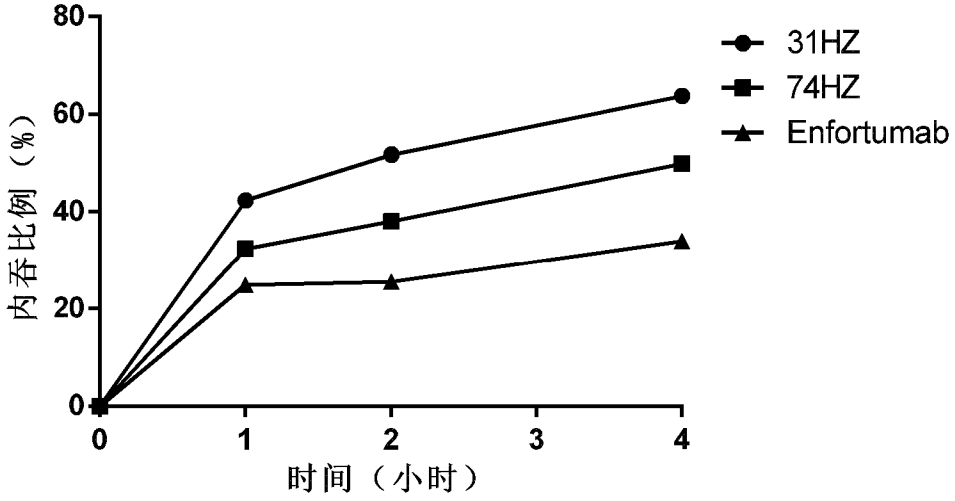

80
60
40
20
0
内吞比例（%）
0
1
2
3
4
时间（小时）
31HZ
74HZ
Enfortumab

图 5A

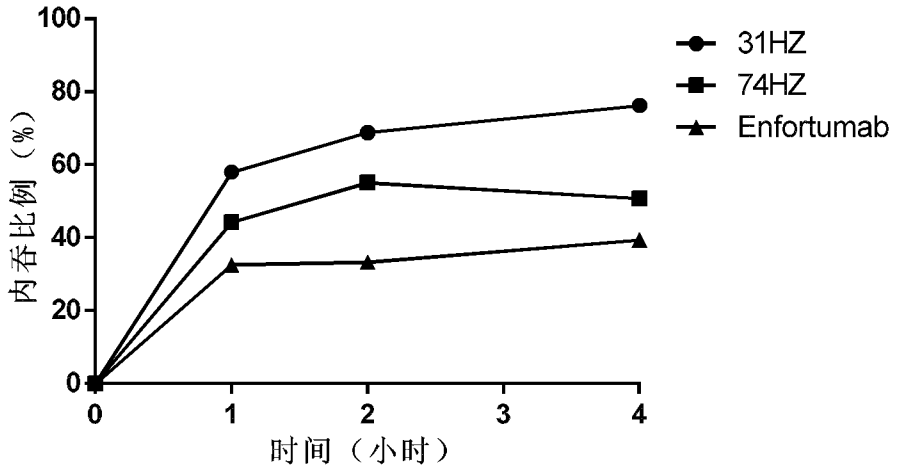

100
80
60
40
20
0
内吞比例（%）
0
1
2
3
4
时间（小时）
31HZ
74HZ
Enfortumab

图 5B

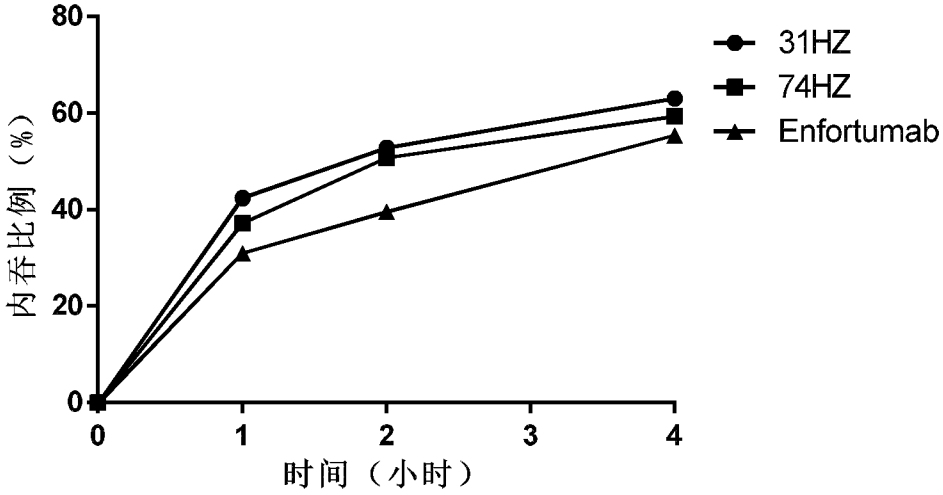

80
60
40
20
0
内吞比例（%）
0
1
2
3
4
时间（小时）
31HZ
74HZ
Enfortumab

图 5C

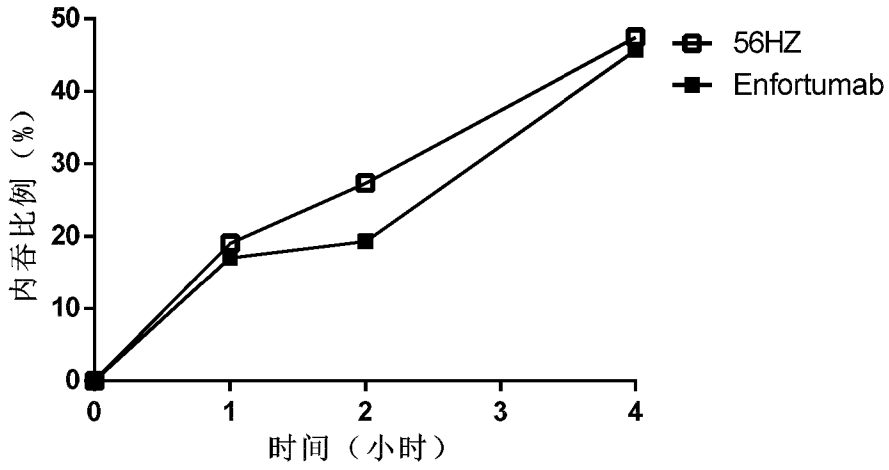

50
40
30
20
10
0
内吞比例（%）
0
1
2
3
4
时间（小时）
56HZ
Enfortumab

图 5D

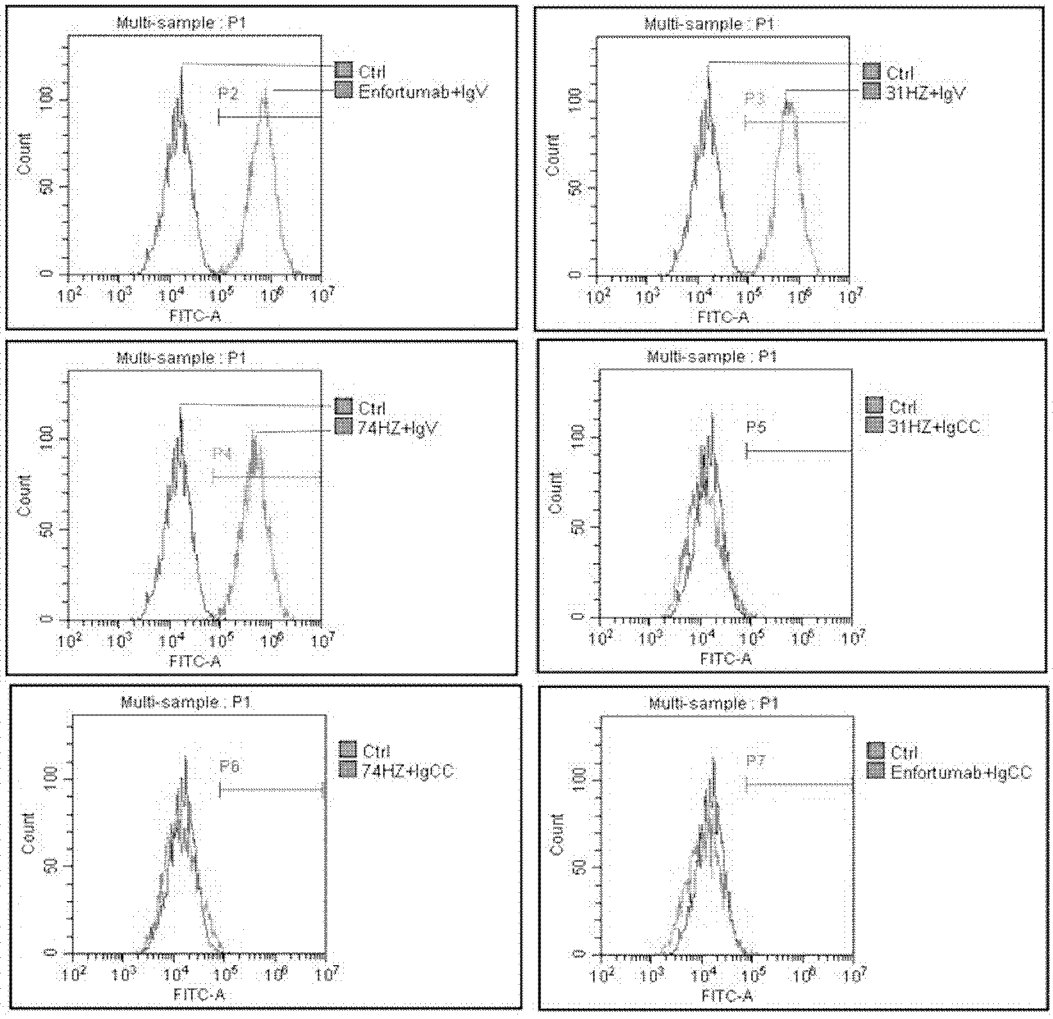

Multi-sample : P1
Ctrl
Enfortumab+IgV
P2
Count
FITC-A
Multi-sample : P1
Ctrl
31HZ+IgV
P3
Count
FITC-A
Multi-sample : P1
Ctrl
74HZ+IgV
P4
Count
FITC-A
Multi-sample : P1
Ctrl
31HZ+IgCC
P5
Count
FITC-A
Multi-sample : P1
Ctrl
74HZ+IgCC
P6
Count
FITC-A
Multi-sample : P1
Ctrl
Enfortumab+IgCC
P7
Count
FITC-A

图 6A

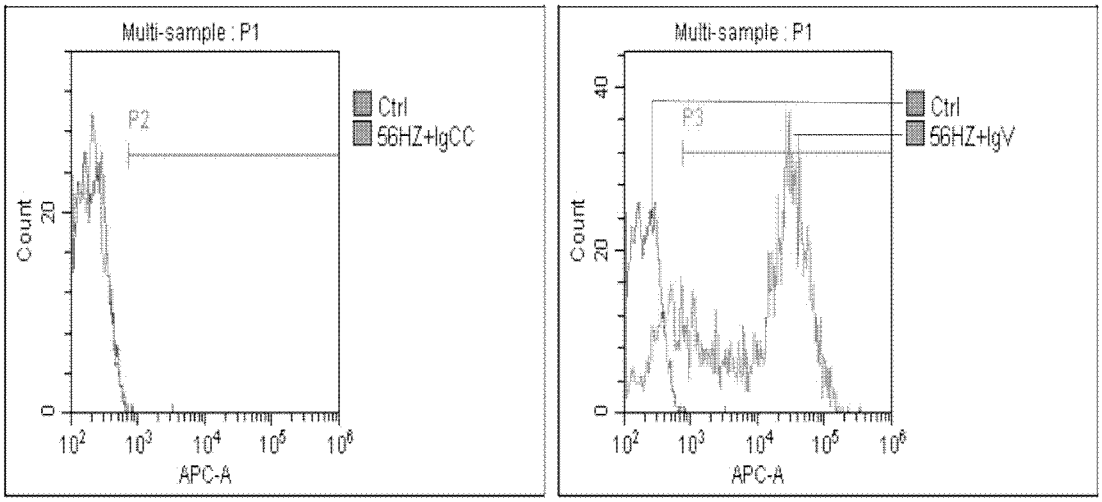

Multi-sample : P1
Ctrl
56HZ+IgCC
P2
Count
APC-A
Multi-sample : P1
Ctrl
56HZ+IgV
P3
Count
APC-A

图 6B

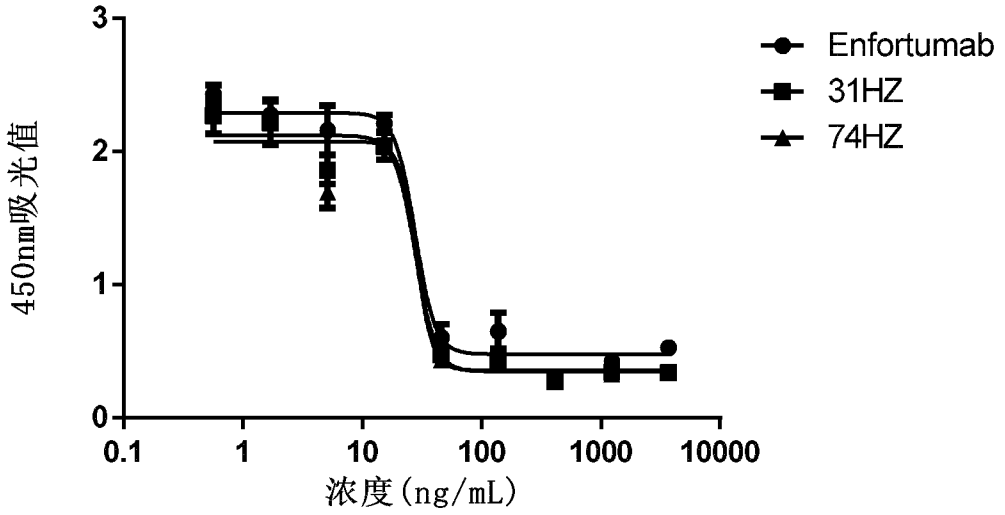

Enfortumab
31HZ
74HZ
450nm吸光值
3
2
1
0
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度(ng/mL)

图 7A

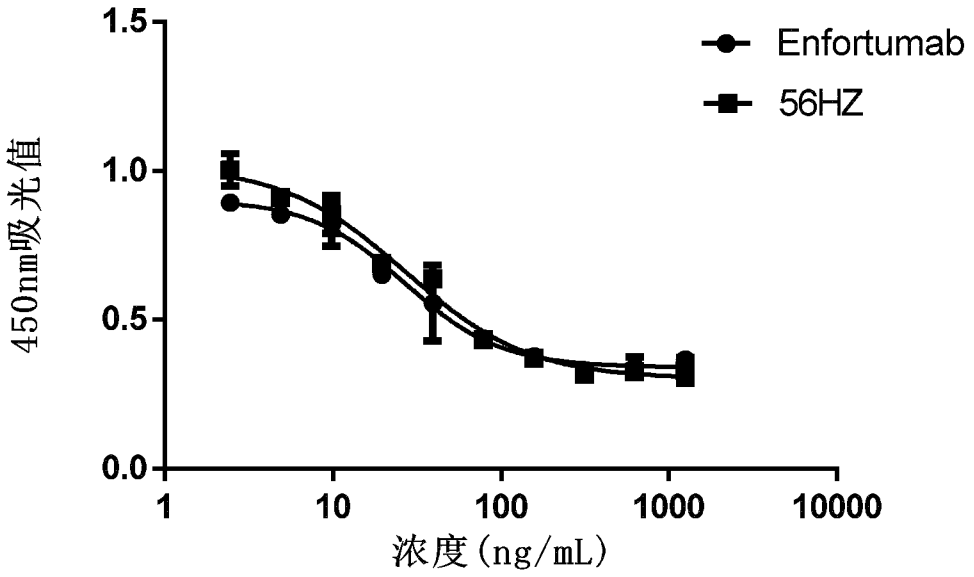

Enfortumab
56HZ
450nm吸光值
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
10000
浓度(ng/mL)

图 7B

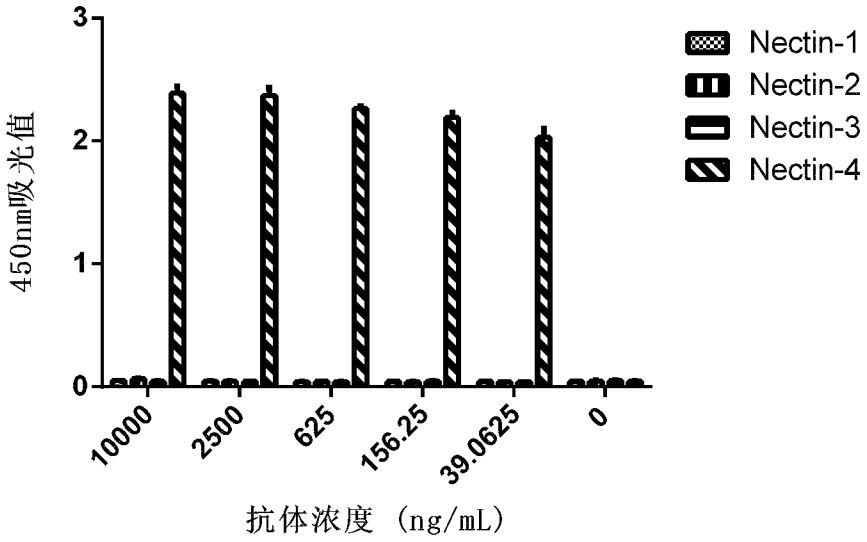

Nectin-1
Nectin-2
Nectin-3
Nectin-4
450nm吸光值
3
2
1
0
10000
2500
625
156.25
39.0625
0
抗体浓度（ng/mL）

图 8A

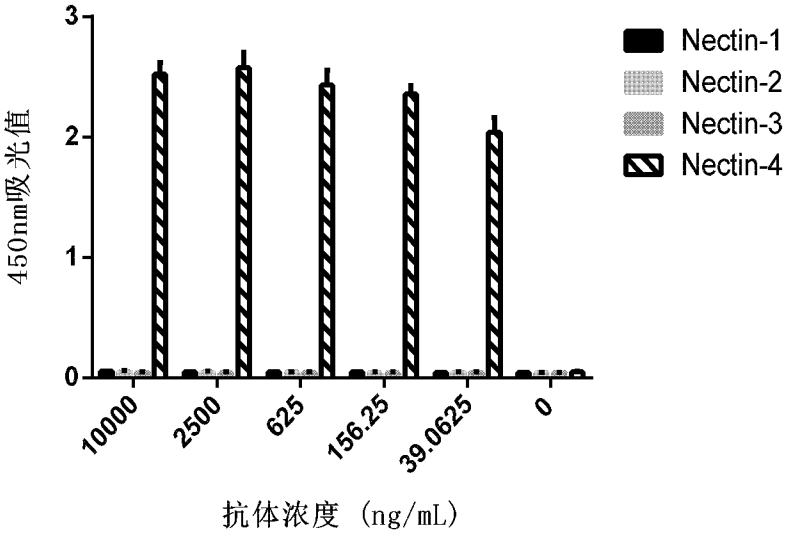

Nectin-1
Nectin-2
Nectin-3
Nectin-4
450nm吸光值
3
2
1
0
10000
2500
625
156.25
39.0625
0
抗体浓度（ng/mL）

图 8B

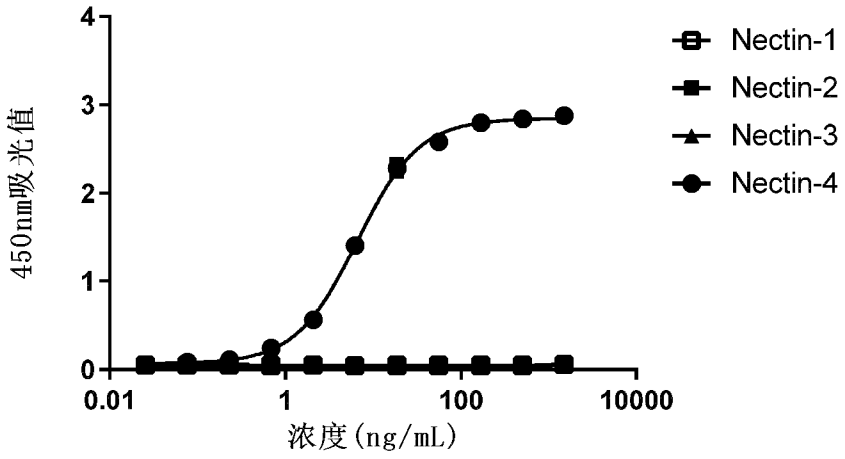

Nectin-1
Nectin-2
Nectin-3
Nectin-4
450nm吸光值
4
3
2
1
0
0.01
1
100
10000
浓度(ng/mL)

图 8C

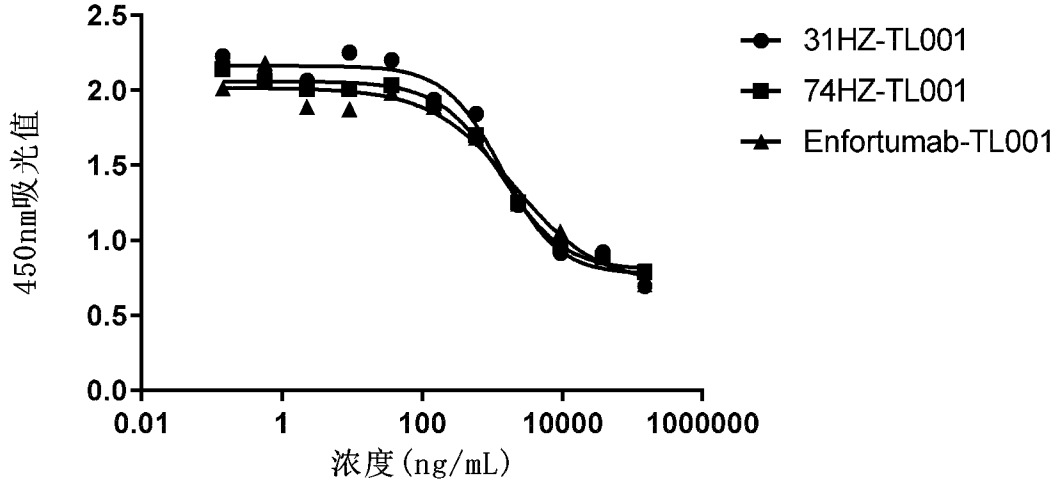

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
450nm吸光值
0.01
1
100
10000
1000000
浓度(ng/mL)
31HZ-TL001
74HZ-TL001
Enfortumab-TL001

图 9A

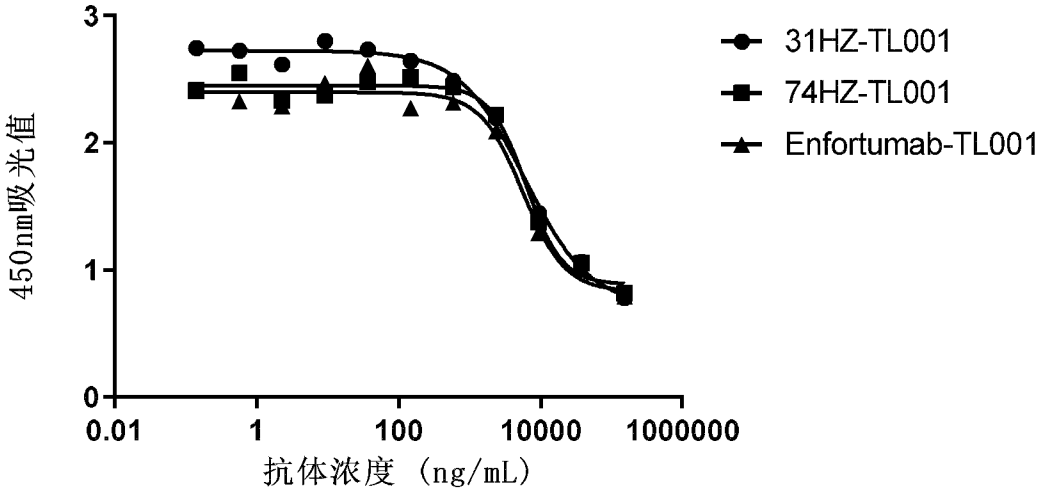

3
2
1
0
450nm吸光值
0.01
1
100
10000
1000000
抗体浓度 (ng/mL)
31HZ-TL001
74HZ-TL001
Enfortumab-TL001

图 9B

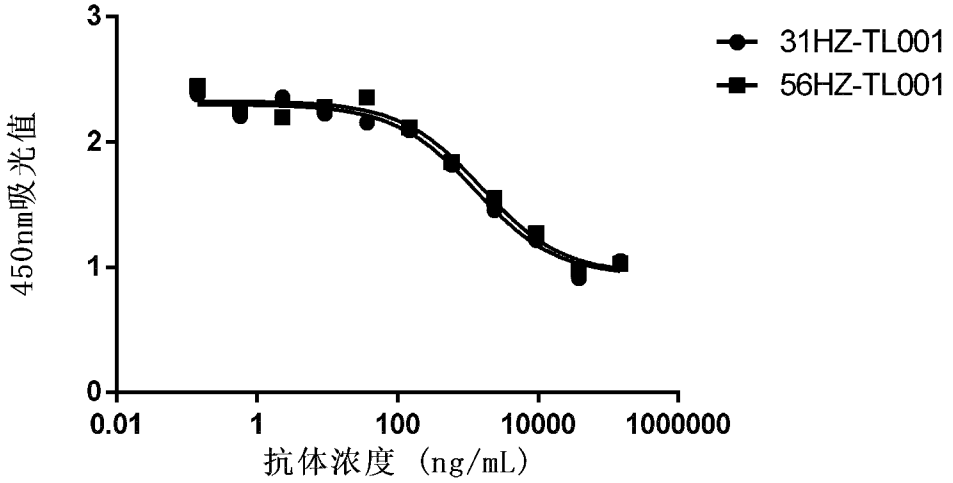

3
2
1
0
450nm吸光值
0.01
1
100
10000
1000000
抗体浓度 (ng/mL)
31HZ-TL001
56HZ-TL001

图 9C

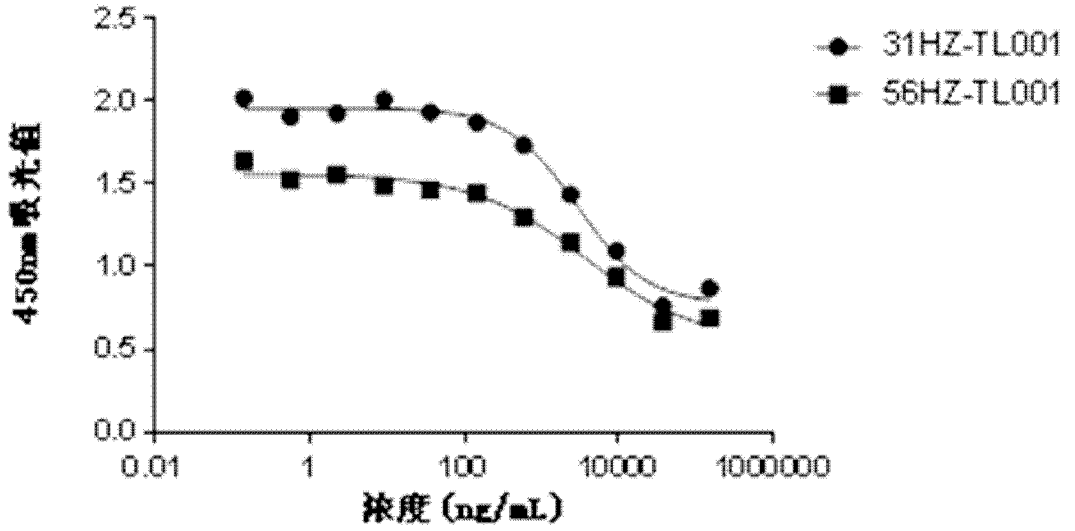


图 9D

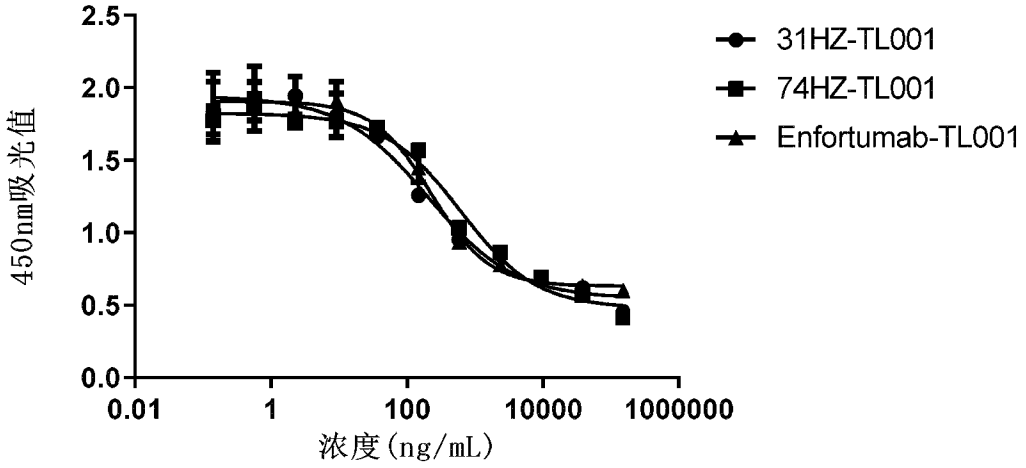


图 10A

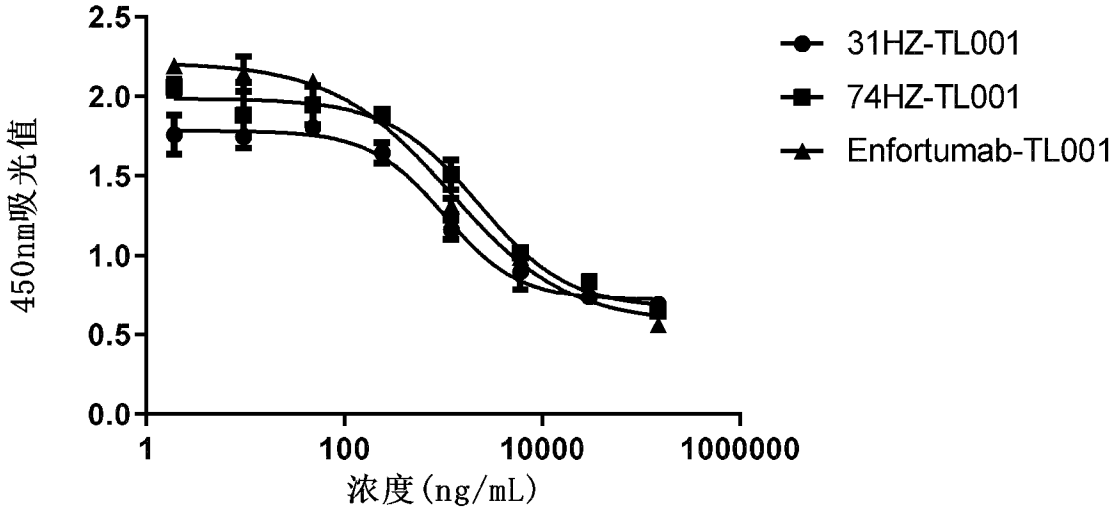


图 10B

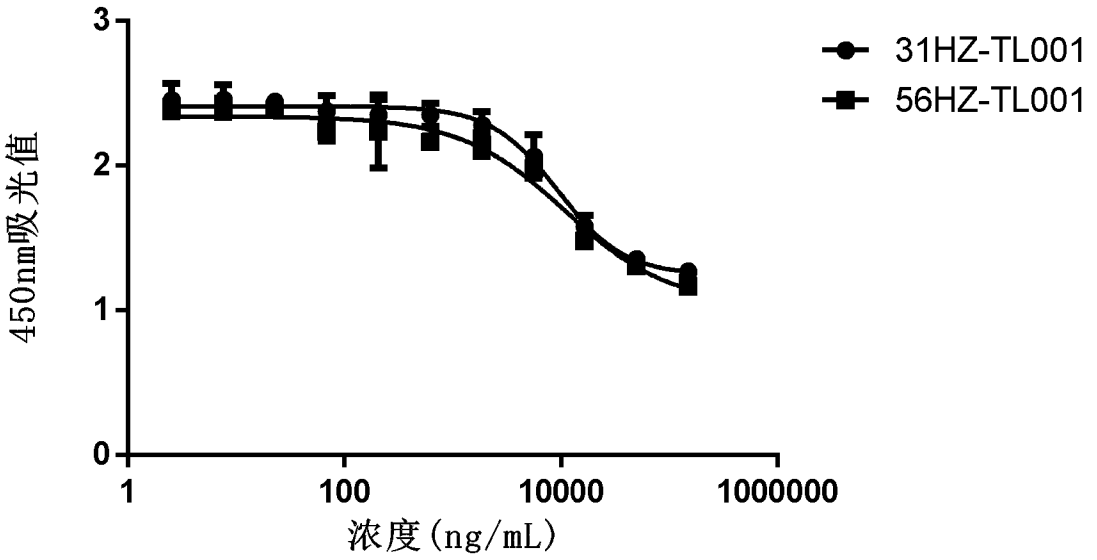

31HZ-TL001
56HZ-TL001
450nm吸光值
3
2
1
0
1
100
10000
1000000
浓度(ng/mL)

图 10C

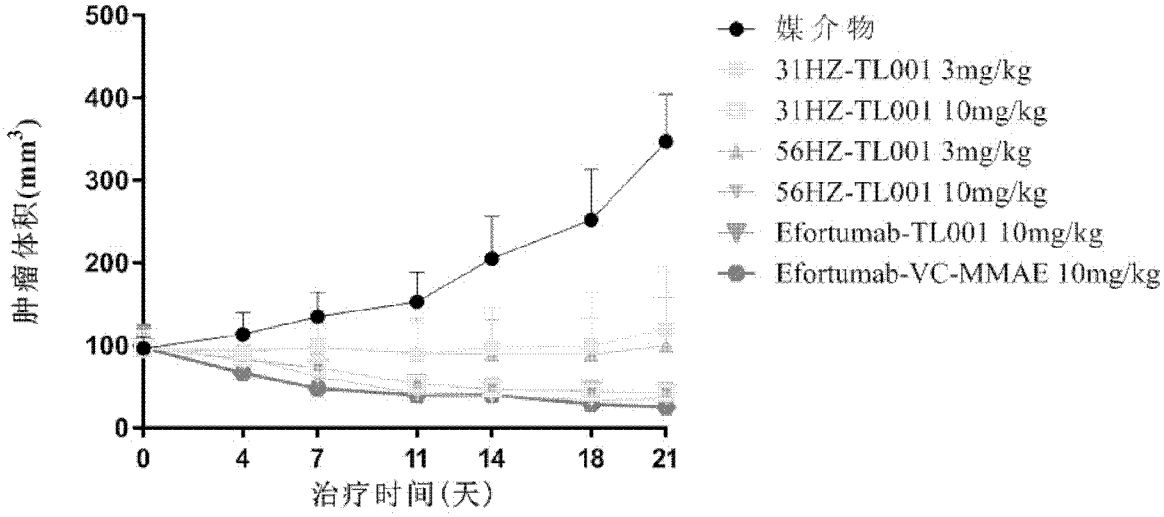

媒介物
31HZ-TL001 3mg/kg
31HZ-TL001 10mg/kg
56HZ-TL001 3mg/kg
56HZ-TL001 10mg/kg
Efortumab-TL001 10mg/kg
Efortumab-VC-MMAE 10mg/kg
肿瘤体积(mm3)
500
400
300
200
100
0
0
4
7
11
14
18
21
治疗时间(天)

图 11

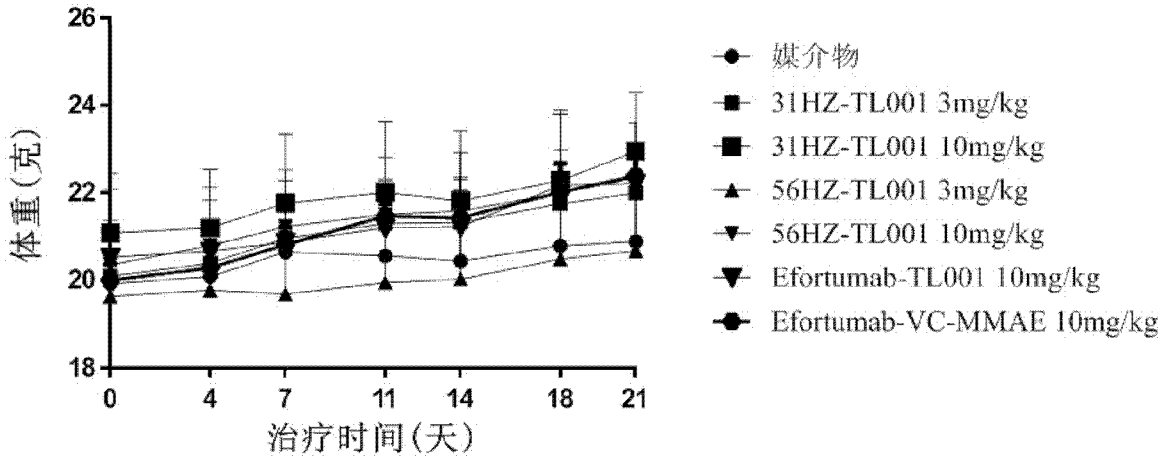

体重(克)
26
24
22
20
18
0
4
7
11
14
18
21
治疗时间(天)
媒介物
31HZ-TL001 3mg/kg
31HZ-TL001 10mg/kg
56HZ-TL001 3mg/kg
56HZ-TL001 10mg/kg
Efortumab-TL001 10mg/kg
Efortumab-VC-MMAE 10mg/kg

图 12

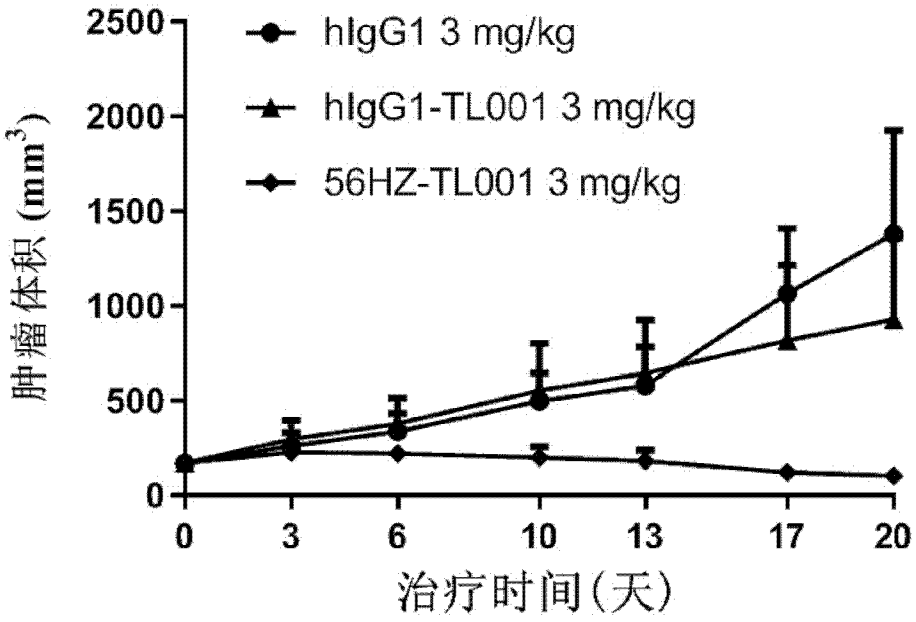

肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
3
6
10
13
17
20
治疗时间(天)
hIgG1 3 mg/kg
hIgG1-TL001 3 mg/kg
56HZ-TL001 3 mg/kg

图 13

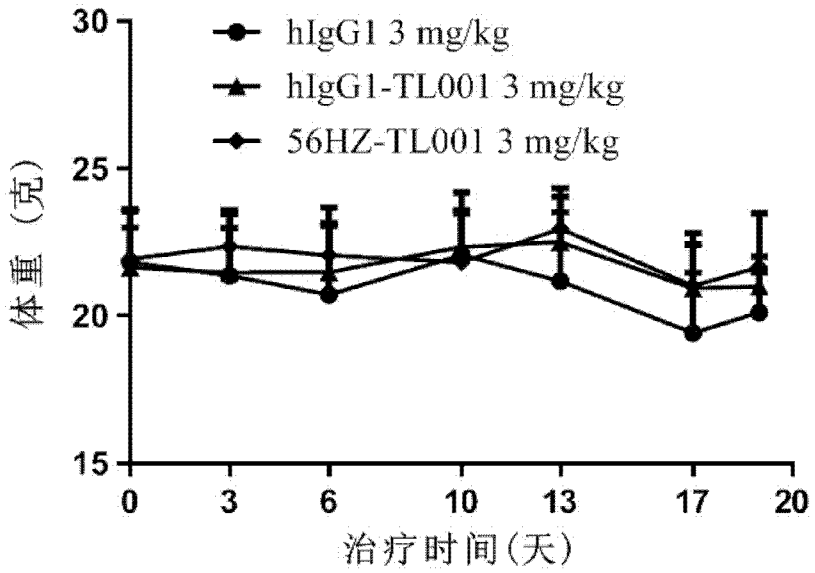

hIgG1 3 mg/kg
hIgG1-TL001 3 mg/kg
56HZ-TL001 3 mg/kg
体重（克）
30
25
20
15
0
3
6
10
13
17
20
治疗时间（天）

图 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/116651

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, Pubmed, NCBI, EBI, 中国专利生物序列检索系统: Nectin-4, kangti PVRL , antibody, CDR, 可变区, 重链, 轻链, HV, LV, 缀合物, 偶联, 癌症, cancer, tumor, durg, ADC, SEQ ID NOs: 1-64, 四川科伦博泰生物医药股份有限公司

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019215728 A1 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUALEM LTD. et al.) 14 November 2019 (2019-11-14) description page 3 lines 1-9, page 5 lines 14-24, page 14 lines 16-23, page 15 lines 1-20, page 17 lines 6-12, page 21 lines 12-19, page 23 last paragraph, page 25 line 7 to page 26 line 9, page 28 lines 8-16	1-14, 17-30
Y	WO 2019215728 A1 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUALEM LTD. et al.) 14 November 2019 (2019-11-14) description page 3 lines 1-9, page 5 lines 14-24, page 14 lines 16-23, page 15 lines 1-20, page 17 lines 6-12, page 21 lines 12-19, page 23 last paragraph, page 25 line 7 to page 26 line 9, page 28 lines 8-16	15-16, 18, 26-29
Y	WO 2019114666 A1 (SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICA CO., LTD.) 20 June 2019 (2019-06-20) description page 2 last paragraph to page 3 paragraph 1, page 4 paragraph 4, page 15 last line to page 29 last line	15-16, 18, 26-29
X	WO 2018226578 A1 (AGENSYS, INC.) 13 December 2018 (2018-12-13) claims 1-85	1-14, 17-30

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 November 2021	**01 December 2021**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018226578 A1 (AGENSYS, INC.) 13 December 2018 (2018-12-13) claims 1-85	15-16, 18, 26-29
X	CN 110392697 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE et al.) 29 October 2019 (2019-10-29) description paragraphs 5-181	1-14, 17-30
Y	CN 110392697 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE et al.) 29 October 2019 (2019-10-29) description paragraphs 5-181	15-16, 18, 26-29
Y	CN 110903395 A (SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICA CO., LTD.) 24 March 2020 (2020-03-24) description, paragraphs 50-60	15-16, 18, 26-29
A	CN 106729743 A (SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICA CO., LTD.) 31 May 2017 (2017-05-31) entire document	1-30
A	HANNA, K.S. "Enfortumab vedotin to treat urothelial carcinoma" *Drugs Today (Barc),* Vol. 56, No. 5, 31 May 2020 (2020-05-31), pp. 329-335	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/116651

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/116651

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019215728	A1	14 November 2019	CA	3097679	A1	14 November 2019
				CN	112088167	A	15 December 2020
				KR	20210009308	A	26 January 2021
				AU	2019264965	A1	19 November 2020
				IL	277858	D0	30 November 2020
				EP	3790900	A1	17 March 2021
				US	2021130459	A1	06 May 2021
WO	2019114666	A1	20 June 2019	KR	20200099123	A	21 August 2020
				EP	3725798	A1	21 October 2020
				JP	2021506743	A	22 February 2021
				CN	111295389	A	16 June 2020
				CA	3080236	A1	20 June 2019
				US	2020347075	A1	05 November 2020
				US	2021101906	A2	08 April 2021
WO	2018226578	A1	13 December 2018	WO	2018226578	A8	31 May 2019
				US	2020231670	A1	23 July 2020
				JP	2020522261	A	30 July 2020
				TW	201902922	A	16 January 2019
				CA	3065514	A1	13 December 2018
				KR	20200024788	A	09 March 2020
				EP	3635013	A4	24 February 2021
				CN	111051345	A	21 April 2020
				EP	3635013	A1	15 April 2020
				BR	112019025513	A2	23 June 2020
				CN	111675761	A	18 September 2020
CN	110392697	A	29 October 2019	EP	3589654	A1	08 January 2020
				WO	2018158398	A1	07 September 2018
				JP	2020510432	A	09 April 2020
CN	110903395	A	24 March 2020	None			
CN	106729743	A	31 May 2017	AU	2016359514	A1	26 April 2018
				CA	3000763	A1	01 June 2017
				EP	3381469	B1	30 June 2021
				JP	6888871	B2	16 June 2021
				CN	109395089	A	01 March 2019
				US	2019076438	A1	14 March 2019
				EP	3381469	A4	31 July 2019
				CN	109395090	A	01 March 2019
				JP	2019502650	A	31 January 2019
				WO	2017088734	A1	01 June 2017
				CN	107921124	A	17 April 2018
				EP	3381469	A1	03 October 2018
				EA	201792590	A1	29 March 2019
				CN	107921124	B	28 December 2018
				HK	1243957	B	04 October 2019
				KR	20180080128	A	11 July 2018

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/116651

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS,CNTXT,SIPOABS,DWPI,WOTXT,USTXT,EPTXT,CNKI,万方数据库,Pubmed，NCBI，EBI，中国专利生物序列检索系统:Nectin-4,kangti PVRL ,antibody,CDR, 可变区，重链，轻链，HV，LV，缀合物，偶联，癌症,cancer，tumor，durg, ADC, SEQ ID NOs：1-64，四川科伦博泰生物医药股份有限公司

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2019215728 A1 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUALEM LTD.等) 2019年 11月 14日 (2019-11-14) 说明书第3页第1-9行，第5页第14-24行，第14页第16-23行，第15页第1-20行，第17页第6-12行，第21页第12-19行，第23页最后一段，第25页第7行至第26页第9行，第28页第8-16行	1-14，17-30
Y	WO 2019215728 A1 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUALEM LTD.等) 2019年 11月 14日 (2019-11-14) 说明书第3页第1-9行，第5页第14-24行，第14页第16-23行，第15页第1-20行，第17页第6-12行，第21页第12-19行，第23页最后一段，第25页第7行至第26页第9行，第28页第8-16行	15-16， 18，26-29
Y	WO 2019114666 A1 (四川科伦博泰生物医药股份有限公司) 2019年 6月 20日 (2019-06-20) 说明书第2页最后一段至第3页第1段，第4页第4段，第15页最后一行至第29页最后一行	15-16， 18，26-29
X	WO 2018226578 A1 (AGENSYS, INC.) 2018年 12月 13日 (2018-12-13) 权利要求1-85	1-14， 17-30

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2021年 11月 13日	2021年 12月 1日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 武雪梅 电话号码 86-(10)-53961961

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	WO 2018226578 A1 (AGENSYS, INC.) 2018年 12月 13日 (2018-12-13) 权利要求1-85	15-16, 18, 26-29
X	CN 110392697 A (国家医疗保健研究所等) 2019年 10月 29日 (2019-10-29) 说明书第5-181段	1-14, 17-30
Y	CN 110392697 A (国家医疗保健研究所等) 2019年 10月 29日 (2019-10-29) 说明书第5-181段	15-16, 18, 26-29
Y	CN 110903395 A (四川科伦博泰生物医药股份有限公司) 2020年 3月 24日 (2020-03-24) 说明书第50-60段	15-16, 18, 26-29
A	CN 106729743 A (四川科伦博泰生物医药股份有限公司) 2017年 5月 31日 (2017-05-31) 全文	1-30
A	HANNA, K.S. "Enfortumab vedotin to treat urothelial carcinoma" Drugs Today (Barc), 第56卷, 第5期, 2020年 5月 31日 (2020-05-31), 第329-335页	1-30

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/116651

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/116651

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2019215728	A1	2019年 11月 14日	CA	3097679	A1	2019年 11月 14日
				CN	112088167	A	2020年 12月 15日
				KR	20210009308	A	2021年 1月 26日
				AU	2019264965	A1	2020年 11月 19日
				IL	277858	D0	2020年 11月 30日
				EP	3790900	A1	2021年 3月 17日
				US	2021130459	A1	2021年 5月 6日
WO	2019114666	A1	2019年 6月 20日	KR	20200099123	A	2020年 8月 21日
				EP	3725798	A1	2020年 10月 21日
				JP	2021506743	A	2021年 2月 22日
				CN	111295389	A	2020年 6月 16日
				CA	3080236	A1	2019年 6月 20日
				US	2020347075	A1	2020年 11月 5日
				US	2021101906	A2	2021年 4月 8日
WO	2018226578	A1	2018年 12月 13日	WO	2018226578	A8	2019年 5月 31日
				US	2020231670	A1	2020年 7月 23日
				JP	2020522261	A	2020年 7月 30日
				TW	201902922	A	2019年 1月 16日
				CA	3065514	A1	2018年 12月 13日
				KR	20200024788	A	2020年 3月 9日
				EP	3635013	A4	2021年 2月 24日
				CN	111051345	A	2020年 4月 21日
				EP	3635013	A1	2020年 4月 15日
				BR	112019025513	A2	2020年 6月 23日
				CN	111675761	A	2020年 9月 18日
CN	110392697	A	2019年 10月 29日	EP	3589654	A1	2020年 1月 8日
				WO	2018158398	A1	2018年 9月 7日
				JP	2020510432	A	2020年 4月 9日
CN	110903395	A	2020年 3月 24日		无		
CN	106729743	A	2017年 5月 31日	AU	2016359514	A1	2018年 4月 26日
				CA	3000763	A1	2017年 6月 1日
				EP	3381469	B1	2021年 6月 30日
				JP	6888871	B2	2021年 6月 16日
				CN	109395089	A	2019年 3月 1日
				US	2019076438	A1	2019年 3月 14日
				EP	3381469	A4	2019年 7月 31日
				CN	109395090	A	2019年 3月 1日
				JP	2019502650	A	2019年 1月 31日
				WO	2017088734	A1	2017年 6月 1日
				CN	107921124	A	2018年 4月 17日
				EP	3381469	A1	2018年 10月 3日
				EA	201792590	A1	2019年 3月 29日
				CN	107921124	B	2018年 12月 28日
				HK	1243957	B	2019年 10月 4日
				KR	20180080128	A	2018年 7月 11日