



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119233994 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 31

(21) 申请号 202380039589.3

(22) 申请日 2023.05.24

(30) 优先权数据

63/345,453 2022.05.25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/063912 2023.05.24

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/227660 EN 2023.11.30

(71) 申请人 先天制药公司

地址 法国马赛

(72) 发明人 M·克雷姆 S·尚特克斯

B·罗西 L·高蒂尔

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

专利代理师 张全信

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

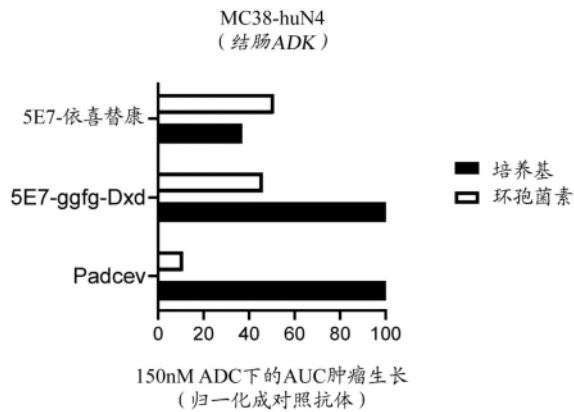
权利要求书5页 说明书115页
序列表(电子公布) 附图21页

(54) 发明名称

NECTIN-4结合剂

(57) 摘要

本发明涉及与Nectin-4多肽结合的抗体和抗体片段。本发明还涉及包含抗体或抗体片段的抗体-药物缀合物,并且涉及制备缀合物的方法,药物组合物,以及使用它们来诊断、治疗或预防疾病(例如以Nectin-4表达性肿瘤细胞为特征的癌症)的方法。



1. 一种特异性结合人Nectin-4多肽的抗体或其抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含:重链可变区(VH),所述重链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:47、49、51、37、39、41、43、45;和轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:65、63、61、59。

2. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含:重链可变区(VH),所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:21、22和23中所示的相应氨基酸序列的CDR1、CDR2、CDR3;和轻链可变区CDR1、CDR2、CDR3,所述轻链可变区CDR1、CDR2、CDR3具有SEQ ID NO:24、25、26中所示的相应氨基酸序列。

3. 根据权利要求2所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含:重链可变区(VH),所述重链可变区包含来自人基因IGKHV-46*01的框架FR1、FR2和FR3氨基酸序列;和轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含来自人基因IGKV-28*01的框架FR1、FR2和FR3氨基酸序列。

4. 根据权利要求3所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含:重链可变区(VH),所述重链可变区进一步包含具有人基因IGHJ4*01的氨基酸序列的框架FR4;和轻链可变区(VL),所述轻链可变区进一步包含具有人基因IGKJ4*01的氨基酸序列的框架FR4。

5. 根据权利要求2至4中任一项所述的抗体或抗体片段,其中位于Kabat重链位置71处的所述氨基酸是亮氨酸并且位于Kabat重链位置78处的所述氨基酸是苏氨酸。

6. 根据权利要求2至5中任一项所述的抗体或抗体片段,其中位于Kabat重链位置73处的所述氨基酸是赖氨酸。

7. 根据权利要求2至6中任一项所述的抗体或抗体片段,其中位于Kabat重链位置28处的所述氨基酸是异亮氨酸。

8. 根据权利要求2至7中任一项所述的抗体或抗体片段,其中位于Kabat重链位置38处的所述氨基酸是赖氨酸。

9. 根据权利要求2至8中任一项所述的抗体或抗体片段,其中位于Kabat重链位置40处的所述氨基酸是精氨酸。

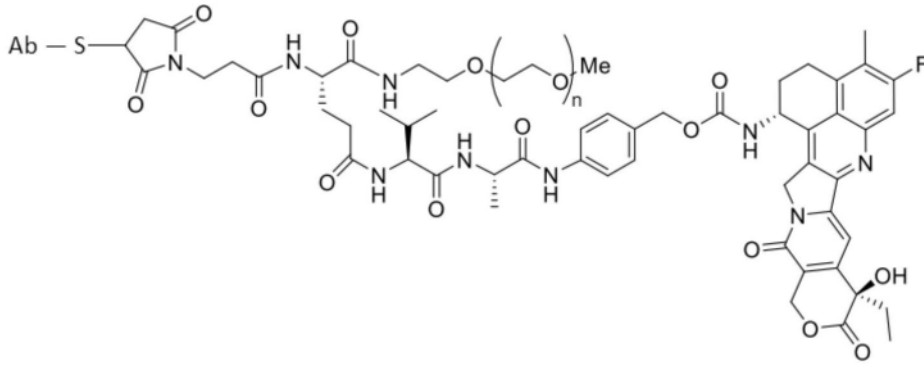
10. 根据权利要求2至9中任一项所述的抗体或抗体片段,其中位于Kabat轻链位置2处的所述氨基酸是缬氨酸并且位于Kabat轻链位置64处的所述氨基酸是丝氨酸。

11. 根据权利要求2至10中任一项所述的抗体或抗体片段,其中位于Kabat轻链位置11处的所述氨基酸是天冬酰胺。

12. 根据权利要求2至11中任一项所述的抗体或抗体片段,其中位于Kabat轻链位置8处的所述氨基酸是丙氨酸。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含:重链可变区(VH),所述重链可变区包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;和轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段与接头-有效载荷部分(X-Z)缀合,其中所述抗体-接头-有效载荷具有以下结构:



其中 n 为1-5。

15. 一种结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物,所述免疫缀合物由式(I)表示:

Ab- (X- (Z)) 式(I)

其中,

Ab是根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或抗体片段,

X是连接Ab和Z的分子,其中X例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下包含可切割部分,任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽;

Z包含细胞毒性剂,任选地是喜树碱类似物,任选地是五环喜树碱类似物,任选地是六环喜树碱类似物,任选地是依喜替康、SN-38或Dxd。

16. 根据权利要求15所述的免疫缀合物,其中免疫缀合物由下式表示:

Ab- (Y) - (X) - (Y') - (Z)

其中,

Ab是特异性结合人Nectin-4多肽的VC1桥接结构域的多肽、肽、抗体;

Y任选地不存在或者是间隔子,任选地是经取代或未经取代的烷基或杂烷基链,任选地其中一个或多个原子可能不是碳,例如是氧、硫、氮或其它原子,任选地其中链的任何碳被烷氧基、羟基、烷基羰氧基、烷基-S-、硫醇、烷基-C(O)S-、胺、烷基胺、酰胺或烷基酰胺取代,其中Y具有2-100个原子的链长,任选地进一步其中Y包括反应性基团与所述抗体的氨基酸的侧链反应的残基;

X是或包括被细胞内肽酶或蛋白酶切割的肽基接头;

Y'任选地不存在或者是间隔子,任选地包含自消除间隔子或非自消除间隔子;并且

Z包含细胞毒性剂,任选地是喜树碱类似物,任选地是五环喜树碱类似物,任选地是六环喜树碱类似物,任选地是依喜替康、SN-38或Dxd。

17. 根据权利要求15至16中任一项所述的免疫缀合物,其中所述蛋白酶可切割肽或肽基接头包含缬氨酸-丙氨酸。

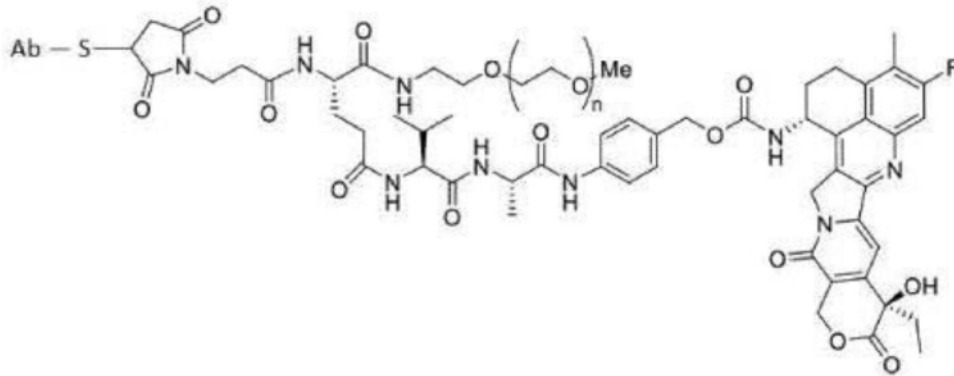
18. 根据权利要求15至16中任一项所述的免疫缀合物,其中所述蛋白酶可切割肽或肽基接头包含苯丙氨酸-赖氨酸或缬氨酸-瓜氨酸。

19. 根据权利要求15至18中任一项所述的免疫缀合物,其中所述间隔子(Y)包含正交连接子部分和结合至所述正交连接子部分的稳定性增强部分,任选地其中所述稳定性增强部分是PEG或PSAR均聚物。

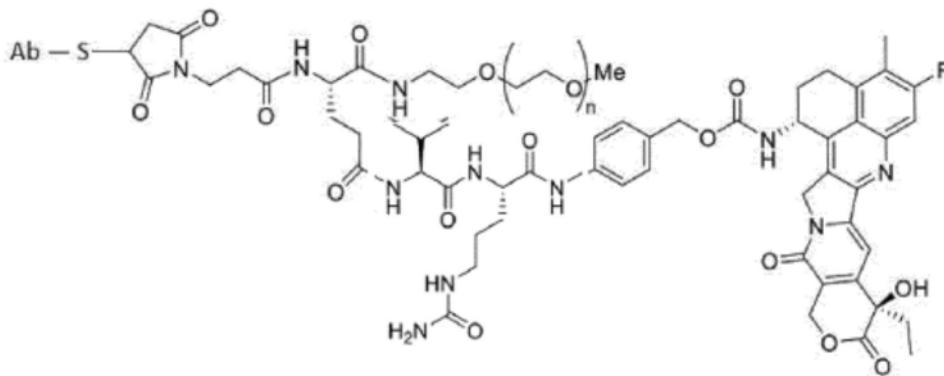
20. 根据权利要求19所述的免疫缀合物,其中所述PEG或PSAR均聚物包含不超过1-6个PEG或PSAR单元,任选地介于8个和1-6个PEG或PSAR单元之间。

21. 根据权利要求1 8至20中任一项所述的免疫缀合物,其中所述正交连接子衍生自谷氨酸。

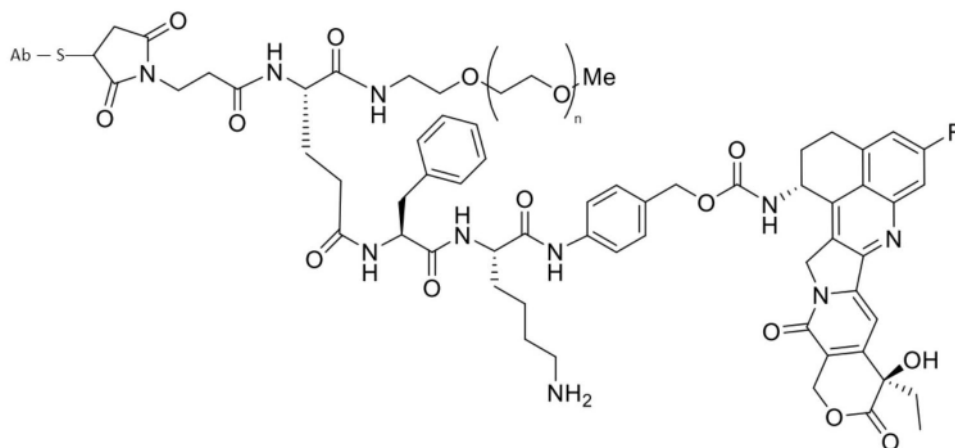
22. 根据权利要求1 5至21中任一项所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由下式中的任一者表示:



或



或



其中n为5-23;并且

其中Ab是特异性结合人Nectin-4多肽的抗体或其抗体片段。

23. 根据权利要求1 5至22中任一项所述的免疫缀合物,其中所述抗体或抗体片段包

含:重链可变区(VH),所述重链可变区包含SEQ ID NOS:47的氨基酸序列;和轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含SEQ ID NOS:65的氨基酸序列。

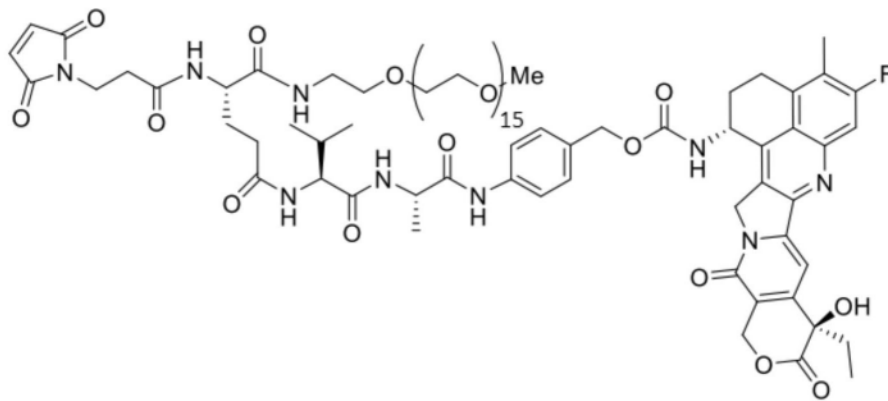
24.根据权利要求15至23中任一项所述的免疫缀合物,其中所述抗体或抗体片段包含:重链,所述重链包含SEQ ID NOS:77的氨基酸序列;和轻链,所述轻链包含SEQ ID NOS:78的氨基酸序列。

25.根据权利要求15至24中任一项所述的免疫缀合物,其中n为1-5,并且所述免疫缀合物的特征在于DAR介于6和8之间,任选地其中所述DAR为6,任选地其中所述DAR为8。

26.一种制备抗体-药物-缀合物(ADC)的方法,所述方法包括将细胞毒性剂(Z)与根据权利要求1至13中任一项所述的抗Nectin-4抗体缀合,其中接头(X)连接所述抗Nectin-4抗体(Ab)和所述细胞毒性剂(Z)。

27.根据权利要求26所述的方法,其中所述方法包括提供根据权利要求1至13中任一项所述的抗Nectin-4抗体,使所述抗Nectin-4抗体与细胞毒性剂(Z)在适合形成抗体药物缀合物的条件下接触和/或反应,以及分离所述抗体药物缀合物。

28.根据权利要求26至27中任一项所述的方法,其中所述方法包括提供根据权利要求1至13中任一项所述的抗Nectin-4抗体,使所述抗Nectin-4抗体与具有下式的接头有效载荷部分(X-Z)接触和/或反应:



29.一种在对其有需要的个体中治疗癌症、杀死肿瘤细胞和/或将细胞毒性剂递送至肿瘤的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的根据权利要求14至25中任一项所述的免疫缀合物或根据权利要求26至28中任一项所述的方法制备的抗体药物缀合物。

30.根据权利要求29所述的方法,其中所述个体患有Nectin-4表达性癌症,所述Nectin-4表达性癌症的特征在于肿瘤细胞上的低或中等Nectin-4表达,任选地如通过免疫化学所确定的。

31.根据权利要求29至30中任一项所述的方法,其中所述个体患有尿路上皮癌、TNBC、非小细胞肺癌、胰腺癌、卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌或食道癌。

32.根据权利要求29至31中任一项所述的方法,其中所述个体已经接受过用化疗剂、任选地被P-糖蛋白(Pgp)转运的化疗剂、铂剂或紫杉烷的先前治疗。

33.根据权利要求29至32中任一项所述的方法,其中所述个体已经接受过用与澳瑞他汀,任选地维汀-恩弗妥单抗汀缀合的Nectin-4结合剂的先前治疗。

34.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至13中任一项所述的抗体、根据权利要求14至25中任一项所述的免疫缀合物或根据权利要求26至38中任一项所述的

方法制备的抗体药物缀合物,以及药学上可接受的载体。

35. 一种核酸或核酸组,所述核酸或核酸组对根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或抗体片段的重链和/或轻链进行编码。

36. 一种杂交瘤或重组宿主细胞,所述杂交瘤或重组宿主细胞产生根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或抗体片段。

37. 一种制备根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或抗体片段的方法,所述方法包括培养根据权利要求36所述的细胞,以及回收所述抗体或抗体片段。

NECTIN-4结合剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年5月25日提交的美国临时申请第63/345,453号的权益,该临时申请全文以引用方式并入本文;包括任何附图。

[0003] 对序列表的引用

[0004] 本申请连同电子格式的序列表一起提交。序列表作为创建于2023年5月22日的大小为97KB的名称为“Nectin-4-3 PCT”的文件提供。该序列表的电子格式中的信息全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0005] 本发明涉及与Nectin-4多肽结合的抗体及其片段。本发明还涉及产生此类化合物的细胞;制备此类化合物的方法;缀合物和制备缀合物的方法;包括该化合物的药物组合物;使用此类化合物来诊断、治疗或预防疾病(例如以Nectin-4表达性肿瘤细胞为特征的癌症)的方法。

背景技术

[0006] Nectin-4是nectin蛋白家族的表面分子,其在发育和成年生活期间在各种生物过程(诸如上皮细胞、内皮细胞、免疫细胞和神经元细胞的极性、增殖、分化和迁移)中起关键作用。Nectin-4最初由Lopez小组于2001年从人气管中克隆出来(参见Reymond等人(2001) *J. Biol. Chem.* 276(46):43205-15)。Nectins是脊髓灰质炎、单纯性疱疹病毒和麻疹病毒的主要受体,并且进一步参与人的几种病理过程。Nectin-4在几种肿瘤中的表达水平显著更高,并且在乳腺癌中尤其过度表达,该乳腺癌包括三阴性乳腺癌(TNBC)(参见M-Rabet等人《肿瘤学年鉴(Ann Oncol.)》2017年4月1日;28(4):769-776)、胰腺癌和尿路上皮癌。此外,nectin-4也在非小细胞肺癌、卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌和食道癌肿瘤样本中表达。Challita-Eid等人(2016)《癌症研究(Cancer Res.)》76(10):3003-3013报道了在膀胱(60%)和乳腺(53%)肿瘤组织中通过免疫组织化学(H评分 ≥ 100)进行的中等至强染色。Zeindler等人2019《医学前沿(Front. Med. 6:200)》报道了在148例TNBC病例中有86例(58%)存在Nectin-4的高表达。在患有这些癌症的患者的血清中,检测到可溶形式的Nectin-4与不良预后相关联。血清Nectin-4的水平在转移进展期间增加并且在治疗后降低。这些结果表明,Nectin-4可能是治疗癌症的可靠靶标。

[0007] 因此,现有技术中已经描述了几种抗Nectin-4抗体。特别地,维汀-恩弗妥单抗(ASG-22ME)是靶向Nectin-4的一种抗体-药物缀合物(ADC),并且目前正在临床研究中用于治疗患有实体瘤的患者。Challita-Eid等人(2016),同上,开发了一种抗Nectin-4抗体,该抗体与基于抗体AGS-22的高效微管破坏剂MMAE缀合。这项工作催生了ADC候选药物维汀-恩弗妥单抗(enfortumab vedotin)(参见美国专利第8,637,642号和PCT公布第W02012/047724号,Agensys公司(Agensys Inc.)),该药物在治疗局部晚期或转移性尿路上皮癌患者的人体临床试验中取得了可喜的结果,这些患者以前曾在新辅助/辅助、局部晚期或转移

性环境中接受过含铂化疗和PD-1/PD-L1检查点抑制剂。其它几个小组也提出了与多种毒性药剂结合的抗Nectin-4药剂。PCT专利申请W02018/158398 (INSERM) 报道了几种抗Nectin-4抗体,并提出了与一系列细胞毒性药剂的潜在偶联。类似地,美国专利第8,637,642号 (Agensys公司) 也提供了抗Nectin-4抗体,并提出了与一系列细胞毒性药剂的潜在偶联。此外,Bicycle Therapeutics公司报道了一种抗Nectin-4靶向剂的开发,该靶向剂包含Nectin-4结合蛋白,该蛋白通过可切割接头缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)与细胞毒性澳瑞他汀(MMAE)有效载荷缀合。迄今为止,已报道在缀合至化疗剂时具有活性的所有抗Nectin-4抗体靶向Nectin-4的Ig样V型结构域,因此认为Ig样V型结构域提供抗Nectin-4 ADC的最强内化。

[0008] 维汀-恩弗妥单抗(抗Nectin-4 ADC)结合Nectin-4的Ig样V型结构域,该Ig样V型结构域与高度内化抗Nectin-4抗体相关。维汀-恩弗妥单抗在EV-201 2期研究(2019)中显示出令人印象深刻的治疗应答,其中UC的ORR(客观应答率)为44%,CR(完全应答率)为12%,大约一半的患者停止治疗。如通过RECIST(48%)或临床症状(5%)所评估的,大部分停药是由于疾病进展。此外,18%的停药患者出现了不良事件,尤其是神经病变。因此,靶向Nectin-4的ADC具有局限性,并且本领域需要针对患有UC和其它癌症的患者的改善益处。

发明内容

[0009] 本文提供了用于Nectin-4结合蛋白的可变重(VH)结构域和可变轻(VL)结构域。本公开的一个目的是提供抗Nectin-4抗体或抗体片段,其包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区与包含SEQ ID NO:37、39、41、43、45、47、49、51、53、55或57的氨基酸序列的重链具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性或100%的同一性),该轻链可变区与包含SEQ ID No:59、61、63或65的氨基酸序列的轻链具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性或100%的同一性)。

[0010] 在一个实施方案中,提供了抗Nectin-4抗体或抗体片段,其包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区与包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的重链具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性),该轻链可变区与SEQ ID NO:70的氨基酸序列具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性)。

[0011] 在一个实施方案中,提供了抗Nectin-4抗体或抗体片段,其包含:重链可变区(VH),该重链可变区(VH)包含分别具有SEQ ID NO:21、22和23的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3以及来自人IGHV1-46*01基因的框架FR1、FR2和FR3氨基酸序列(以及任选地来自人IGHJ4*01基因的另外的框架FR4氨基酸序列);和轻链可变区(VL)CDR1、CDR2和CDR3,该轻链可变区(VL)CDR1、CDR2和CDR3分别具有SEQ ID NO:24、25和26的氨基酸序列以及来自人IGKV2-28*01基因的框架FR1、FR2和FR3氨基酸序列(以及任选地来自人IGKJ4*01基因的另外的框架FR4氨基酸序列)。来自特定人IGHV、IGHJ、IGKV和IGKJ基因的框架序列可包含一个或多个氨基酸取代,如本文进一步描述的。

[0012] 在一个实施方案中,提供了抗Nectin-4抗体或抗体片段,其包含重链可变区,该重链可变区在选自28、38、40、48、69、71、73、78的Kabat位置处包含一个、两个、三个、四个、五

个、六个、七个或八个氨基酸取代。任选地,位于位置28处的苏氨酸残基被异亮氨酸残基取代。任选地,位于位置38处的精氨酸残基被赖氨酸残基取代。任选地,位于位置40处的丙氨酸残基被精氨酸残基取代。任选地,位于位置48处的甲硫氨酸残基被异亮氨酸残基取代。任选地,位于位置69处的甲硫氨酸残基被亮氨酸残基取代。任选地,位于位置71处的精氨酸残基被亮氨酸残基取代。任选地,位于位置73处的苏氨酸残基被赖氨酸残基取代。任选地,位于位置78处的缬氨酸残基被苏氨酸残基取代。

[0013] 在一个实施方案中,提供了抗Nectin-4抗体或抗体片段,其包含轻链可变区,该轻链可变区在选自2、8、11、64的kabat位置处包含一个、两个、三个或四个氨基酸取代。任选地,位于位置2处的异亮氨酸残基被缬氨酸残基取代。任选地,位于位置8处的脯氨酸残基被丙氨酸残基取代。任选地,位于位置11处的亮氨酸残基被天冬酰胺取代。任选地,位于位置64处的甘氨酸残基被丝氨酸残基取代。

[0014] 在一个实施方案中,提供了抗Nectin-4抗体,其包含:重链,该重链与包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的重链具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约70%、85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性);和轻链,该轻链与包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的轻链具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约70%、85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性)。

[0015] 在一个实施方案中,提供了抗Nectin-4抗体或抗体片段,其包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区与包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的重链具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性),该轻链可变区与SEQ ID NO:65的氨基酸序列具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性)。

[0016] 在一个实施方案中,提供了Nectin-4结合蛋白,其包含本公开的抗体或抗体片段,并且任选地进一步包含附加抗原结合结构域。

[0017] 在任何实施方案中,该抗体或抗体片段可任选地被表征为单克隆形式、人源化形式和/或分离形式。

[0018] 在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体或抗体片段结合Nectin-4多肽的VC1桥接结构域。

[0019] 在任何方面,本公开的抗体或抗体片段用于制备抗体药物缀合物(ADC)。在任何方面,本公开的抗体用于减少Nectin-4表达性肿瘤细胞之间的细胞间粘附、抑制Nectin-4:Nectin-1相互作用、抑制Nectin-4:Nectin-4相互作用、减少Nectin-4表达性肿瘤细胞的生长和/或减少Nectin-4表达性肿瘤细胞的簇形成(例如,用于上述的方法中)。

[0020] 根据本发明之一,提供了抗体药物缀合物,其包含缀合至细胞毒性剂的抗Nectin-4抗体或抗体片段,任选地其中该细胞毒性剂经由接头缀合至抗体或抗体片段,并且任选地进一步其中该接头或接头-毒素包含式III至XIV中的任一者。

[0021] 在一个实施方案中,该抗体药物缀合物(ADC)包含与至少一个细胞毒性药物部分连接的抗Nectin-4抗体或抗体片段,其中该抗体或抗体片段包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区与SEQ ID NO:69的氨基酸序列具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性),该轻链可变区与SEQ ID NO:70的氨基酸序列具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、

97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性)。

[0022] 在一个实施方案中,该抗体药物缀合物(ADC)包含:(a)结合至Nectin-4多肽的至少一个抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含(i)重链可变区,该重链可变区与SEQ ID NO:37、39、41、43、45、47、49、51、53、55或57的氨基酸序列具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性),和(ii)轻链可变区,该轻链可变区与SEQ ID NO:59、61、63或65的氨基酸序列具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性);和(b)至少一种细胞毒性药物部分。

[0023] 在优选的实施方案中,该抗体药物缀合物(ADC)包含(a)抗Nectin-4人源化抗体,该抗Nectin-4人源化抗体包含(i)重链可变区,该重链可变区与SEQ ID NO:47的氨基酸序列具有至少80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性),和(ii)轻链可变区,该轻链可变区与SEQ ID NO:65的氨基酸序列具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性)。

[0024] 在一些方面,结合人Nectin-4多肽的抗体(例如,全长抗体、抗体片段)能够减少Nectin-4表达性肿瘤细胞之间的细胞间粘附和/或减少Nectin-4表达性肿瘤细胞的生长和/或簇形成(例如,如使用3维或非粘附性肿瘤细胞培养物所评估的;肿瘤球状体测定),用于制备抗体药物缀合物。

[0025] 在一些方面,该抗体(例如,全长抗体、抗体片段)能够抑制Nectin-4:Nectin-1相互作用和/或Nectin-4:Nectin-4相互作用(例如,该抗体能够减少第一细胞上的Nectin-4与第二细胞上的Nectin-1和/或Nectin-4的相互作用,任选地其中细胞是肿瘤细胞)。

[0026] 在本文的任何方面,抗Nectin-4抗体或抗体片段或者包含此类抗体或片段的抗体-药物缀合物能够在与肿瘤细胞表面上的Nectin-4结合时经历细胞内内化。

[0027] 在一些方面,提供了制备抗体药物缀合物的方法,该方法包括将抗Nectin-4抗体或抗体片段(例如根据本公开的抗体或抗体片段)与细胞毒性剂(例如根据本公开的接头或接头-毒素)缀合。

[0028] 在一些方面,抗体药物缀合物的制备包括将抗体与细胞毒性剂缀合的步骤(例如,通过接头部分,接头部分进一步包含细胞内可切割的部分)。

[0029] 在一个方面,抗Nectin-4抗体或抗体片段通过细胞内可切割的(例如,蛋白酶可切割的)寡肽(例如,二肽、三肽、四肽或五肽)与细胞毒性剂缀合。在一个方面,抗Nectin-4抗体或抗体片段通过细胞内可切割的(例如,蛋白酶可切割的)二肽、三肽、四肽或五肽和自消除间隔子与细胞毒性剂(例如,喜树碱衍生物)缀合。在一个方面,抗Nectin-4抗体或抗体片段通过细胞内可切割的(例如,蛋白酶可切割的)四肽或五肽和自消除或非自消除间隔子与细胞毒性剂(例如,喜树碱衍生物)缀合。

[0030] 在一个方面,细胞毒性剂是高度有效的化疗剂,任选地是选自由以下组成的组的细胞毒性剂:紫杉烷类、蒽环类(anthracyclines)、喜树碱类、埃博霉素类(epothilones)、丝裂霉素类(mytomycins)、康普瑞汀类(combretastatins)、长春花生物碱类(vinca alkaloids)、氮芥类(nitrogen mustards)、美登木素类(maytansinoids)、倍癌霉素类(duocarmycins)、微管溶素类(tubulysins)、尾海兔素类(dolastatins)和澳瑞他汀类、烯

二炔类(例如,卡奇霉素类(calicheamicins)、埃斯波霉素类(esperamicins)、shishijimicins和namenamicins)、吡咯并苯二氮卓类(例如,吡咯并苯二氮卓二聚体和吡啶并-吡咯并苯二氮卓二聚体)、鹅膏毒素类(amatoxins)和乙烯亚胺类。在一个实施方案中,细胞毒性剂是DNA损伤剂,包括例如DNA嵌入剂,例如将其自身插入到细胞的DNA结构中并结合DNA从而引起DNA损伤的剂(例如柔红霉素(daunorubicin))。化合物包括拓扑异构酶抑制剂,即阻断拓扑异构酶(拓扑异构酶I和II)作用的化学化合物。此类化合物用于广泛的实体瘤和血液恶性肿瘤,特别是淋巴瘤。拓扑异构酶I抑制剂包括喜树碱类,例如伊立替康(irinotecan)(被批准用于治疗结肠癌)、拓扑替康(topotecan)(被批准用于治疗卵巢癌和肺癌)、喜树碱、片螺素D(lamellarin D)、茛并异喹啉(indenoisoquinoline)、茛替康(indimitecan)。另外的喜树碱类包括斯拉替康(silatecan)、柯西替康(cositecan)、依喜替康、勒托替康(lurtotecan)、吉马替康(gimatecan)、贝洛替卡(belotecan)和鲁比替康(rubitecan)。拓扑异构酶II抑制剂包括例如依托泊苷(etoposide)(VP-16)、替尼泊苷(teniposide)、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素、米托蒽醌(mitoxantrone)、安吡啉(amsacrine)、玫瑰树碱(ellipticines)、金精三羧酸(aurintricarboxylic acid)和HU-331(由大麻二酚(cannabidiol)合成的喹诺酮(quinolone))。

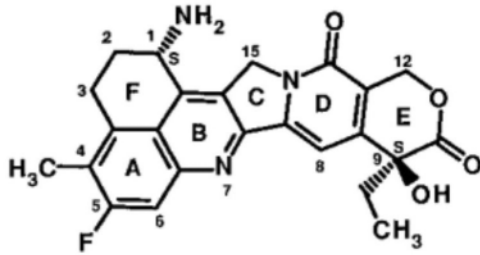
[0031] 任选地,抗体或抗体片段用式III至XIV中任一者的接头-毒素来官能化(例如缀合、共价结合)。

[0032] 在一个方面,细胞毒性剂是喜树碱类似物,例如依喜替康、Dxd或SN-38分子。

[0033] 在一个方面,本发明提供了本公开的Nectin-4结合抗体或抗体片段,该抗体或抗体片段与喜树碱(例如喜树碱类似物、依喜替康或依喜替康衍生物、Dxd分子或SN-38分子)缀合(例如共价结合)。

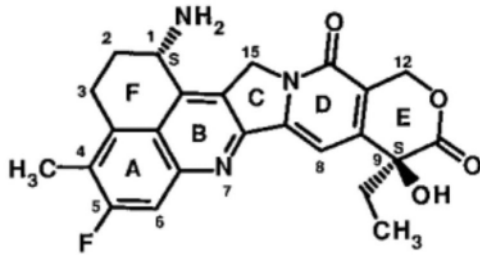
[0034] 在本文的任何实施方案中,本公开的与喜树碱类似物(例如依喜替康或SN-38分子)缀合(例如共价结合)的Nectin-4结合抗体或抗体片段可被表征为包含具有一个或多个氨基酸残基(例如半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺残基、非天然氨基酸残基)的与人Nectin-4多肽特异性结合的抗体,该一个或多个氨基酸残基通过接头用包含化合物1或2的结构的分子来官能化。在本文的任何实施方案中,Nectin-4抗体或抗体片段可被表征为用具有式III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII或XIV的结构的接头-喜树碱分子来官能化,或用化合物3至16中的任一者来官能化。

[0035] 在一个实施方案中,与喜树碱衍生物缀合的Nectin-4抗体或抗体片段是与依喜替康分子,例如具有化合物1(1a或1b)的结构的分子缀合的Nectin-4抗体或抗体片段。在任何实施方案中,可切割接头或包含接头的免疫缀合物或ADC可以表征为例如在接头的酶促切割时,释放依喜替康分子,例如具有化合物1(1a或1b)的结构的分子。在一个实施方案中,与喜树碱衍生物缀合的人源化Nectin-4抗体或抗体片段是与SN-38分子(例如具有化合物2的结构的分子)缀合的Nectin-4抗体或抗体片段。在一个实施方案中,Nectin-4抗体或抗体片段可以被表征为包含具有一个或多个氨基酸残基(例如半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺或非天然氨基酸残基)的与人Nectin-4多肽特异性结合的抗体,该一个或多个氨基酸残基通过接头(例如,具有或不具有另外的间隔子,例如本文所述的间隔子(Y')的可切割接头分子)用具有以下结构的分子官能化:



化合物 1a

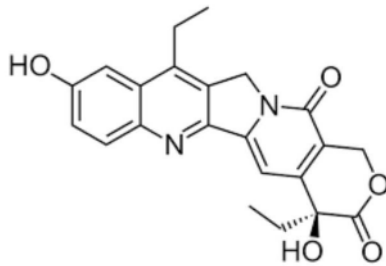
[0036] 或



化合物 1b

或

[0037]



化合物 2。

[0038] 在一个实施方案中,与细胞毒性剂缀合的Nectin-4抗体或抗体片段可被指定为由式(I)表示的免疫缀合物:

[0039] Ab-X-Z 式(I)

[0040] 其中,

[0041] Ab是特异性结合人Nectin-4多肽的抗体或抗体片段(例如,本公开的任何抗体或抗体片段,任选地该抗体结合人Nectin-4的VC1桥接结构域和/或显示与结合野生型人Nectin-4多肽相比降低的对包含残基K197和/或S199处的氨基酸取代的突变人Nectin-4多肽(参照SEQ ID NO:1)的结合);

[0042] X是连接Ab和Z的接头分子(例如,与Ab和Z中的每一个共价结合),其中X包含例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下可切割的部分,任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽,任选地其中X进一步包含定位在可切割部分和Z之间的自消除或非自消除间隔子系统(Y'),任选地其中X进一步包含定位在Ab和可切割部分之间的间隔子(Y);并且

[0043] Z是细胞毒性剂,任选地其中Z是喜树碱类似物,任选地其中Z是依喜替康,任选地

其中Z是依喜替康并且接头的切割导致释放具有化合物1的结构的化合物(依喜替康)。

[0044] 在一个实施方案中,与细胞毒性剂缀合的Nectin-4抗体或抗体片段可以被指定为由式(I)表示的免疫缀合物:

[0045] Ab-X-Z 式(I)

[0046] 其中,

[0047] Ab是根据本公开的特异性结合人Nectin-4多肽的抗体或抗体片段;

[0048] X是连接Ab和Z的接头分子(例如,与Ab和Z中的每一个共价结合),其中X包含缬氨酸-瓜氨酸、缬氨酸-丙氨酸或苯丙氨酸-赖氨酸二肽,其中X进一步包含定位在可切割部分和Z之间的自消除或非自消除间隔子系统(Y'),并且其中X进一步包含定位在Ab和可切割部分之间的间隔子(Y);并且

[0049] Z是细胞毒性剂,任选地是喜树碱类似物,任选地是依喜替康分子或SN-38分子。

[0050] 在一个实施方案中,提供了一种将细胞毒性剂(任选地喜树碱类似物)递送或靶向至肿瘤的方法、一种在肿瘤中(例如在患有癌症的受试者中)释放细胞毒性剂(任选地喜树碱类似物、Dxd、依喜替康)的方法、或一种使肿瘤或癌症对细胞毒性剂(任选地喜树碱类似物)敏化的方法,该方法包括向患有癌症的受试者施用由式(I)表示的免疫缀合物:

[0051] Ab-X-Z 式(I)

[0052] 其中,

[0053] Ab是特异性结合人Nectin-4多肽的抗体或抗体片段;

[0054] X是连接Ab和Z的接头分子(例如,与Ab和Z中的每一个共价结合),其中X包含例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下可切割的部分,任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽,任选地其中X进一步包含定位在可切割部分和Z之间的自消除或非自消除间隔子系统(Y'),任选地其中X进一步包含定位在Ab和可切割部分之间的间隔子(Y);并且

[0055] Z是细胞毒性剂,任选地是喜树碱类似物,任选地是依喜替康分子或SN-38分子,任选地其中Z是依喜替康并且其中接头的切割导致释放具有化合物1的结构的化合物(依喜替康)。

[0056] 在一个实施方案中,与细胞毒性剂(任选地喜树碱类似物)缀合的抗体或抗体片段可以被指定为由式(II)表示的免疫缀合物:

[0057] $Ab-(X-(Z)_n)_m$ 式(II)

[0058] 其中,

[0059] Ab是根据本公开的特异性结合人Nectin-4多肽的抗体或抗体片段;

[0060] X是连接Ab和Z的接头分子,其中X包括例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下可切割的部分,任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽,任选地其中X进一步包含定位在所述可切割部分和Z之间的自消除或非自消除间隔子系统(Y'),任选地其中X进一步包含定位在Ab和所述可切割部分之间的间隔子(Y);

[0061] Z是细胞毒性剂,任选地是喜树碱类似物,任选地Z是包含依喜替康分子或SN-38分子的分子,例如具有化合物1或2的结构的分子;

[0062] n为1;以及

[0063] m为4到8,或任选地m为选自4、5、6、7或8的整数。

[0064] 在一个实施方案中,与细胞毒性剂(任选地喜树碱类似物)缀合的Nectin-4抗体或

抗体片段可以表征为由式 (II) 表示的免疫缀合物的组合物:

[0065] $Ab-(X-(Z)_n)_m$ 式 (II)

[0066] 其中,

[0067] Ab是根据本公开的特异性结合人Nectin-4多肽的抗体或抗体片段;

[0068] X是连接Ab和Z的分子,其中X包括例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下可切割的部分,任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽,任选地其中X进一步包含定位在所述可切割部分和Z之间的自消除或非自消除间隔子系统(Y'),任选地其中X进一步包含定位在Ab和所述可切割部分之间的间隔子(Y);

[0069] Z是细胞毒性剂,任选地是喜树碱类似物,任选地Z是包含依喜替康分子或SN-38分子分子;

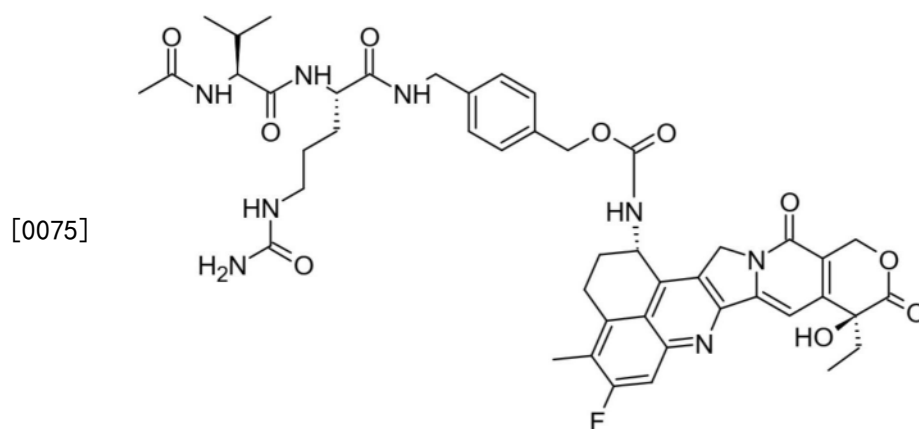
[0070] 其中n为1,并且该组合物中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%的免疫缀合物具有介于2和4之间、介于4和8之间,任选地介于6和8之间的m(X-Z部分的数量)。任选地该组合物中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%的免疫缀合物的m为,或至少为4、6、7或8。

[0071] 在式I或II中,(X-Z)部分可任选地被表征为具有式III至XI中任一者或化合物3-12中任一者的结构。

[0072] 在式I或II中,分子X或间隔子Y可以任选地被指定为包含反应性基团(R)或反应性基团(R)与抗原结合蛋白(例如,抗体)的氨基酸或与附接至抗体或抗体片段的氨基酸的互补反应性基团(R')的反应的残基。

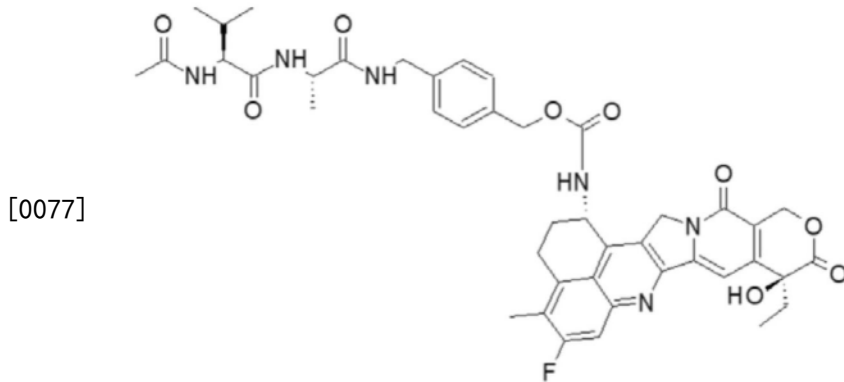
[0073] 在本文的任何实施方案中,依喜替康分子可以被指定为通过依喜替康的位置1处的胺与接头(X)结合(当依喜替康分子是接头的一部分时,NH替换位置1处的 NH_2)。在一个实施方案中,依喜替康与接头(X)结合,例如与X的对氨基苄氧羰基(PAB)自消除间隔子部分的羰基结合。在本文的任何实施方案中,SN-38分子可被指定为通过位置9处的OH与接头(X)结合(当化合物2中所示的SN-38分子是接头的一部分时,O替换位置9处的OH)。

[0074] 在一个实施方案中,与依喜替康缀合的Nectin-4结合剂可以被表征为包含具有一个或多个氨基酸残基(例如半胱氨酸残基、谷氨酰胺残基)的与人Nectin-4多肽特异性结合的抗体,该一个或多个氨基酸残基通过间隔子(Y)用包含以下结构的接头-依喜替康分子官能化:

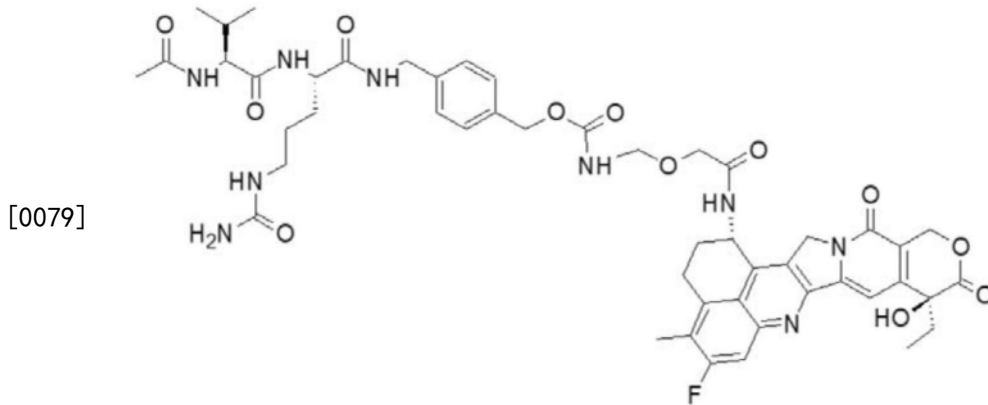


[0076] 在一个实施方案中,与依喜替康缀合的人源化Nectin-4抗体或抗体片段可被表征

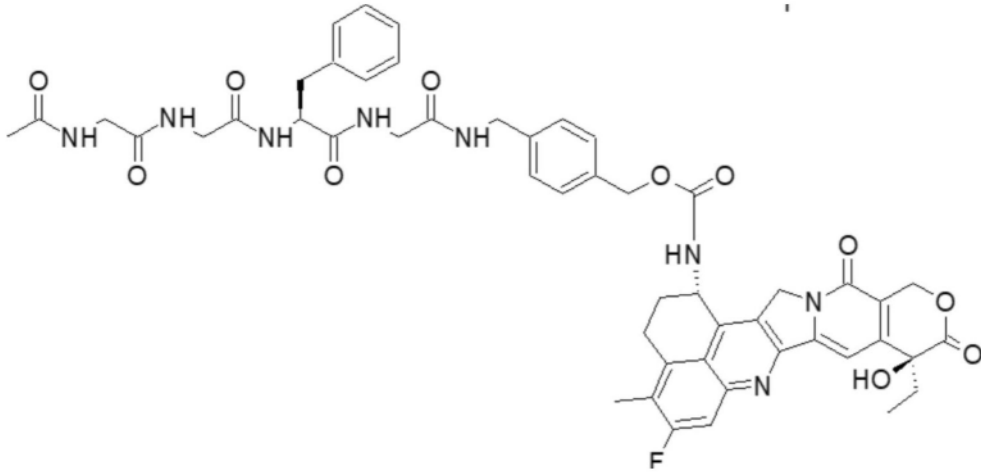
为包含具有一个或多个氨基酸残基(例如半胱氨酸残基、谷氨酰胺残基)的与人Nectin-4多肽特异性结合的抗体,该一个或多个氨基酸残基通过间隔子(Y)用包含以下结构的接头-依喜替康官能化:



[0078] 在一个实施方案中,与依喜替康缀合的人源化Nectin-4抗体或抗体片段可被表征为包含具有一个或多个氨基酸残基(例如半胱氨酸残基、谷氨酰胺残基)的与人Nectin-4多肽特异性结合的抗体,该一个或多个氨基酸残基通过间隔子(Y)用包含以下结构的接头-依喜替康分子官能化:



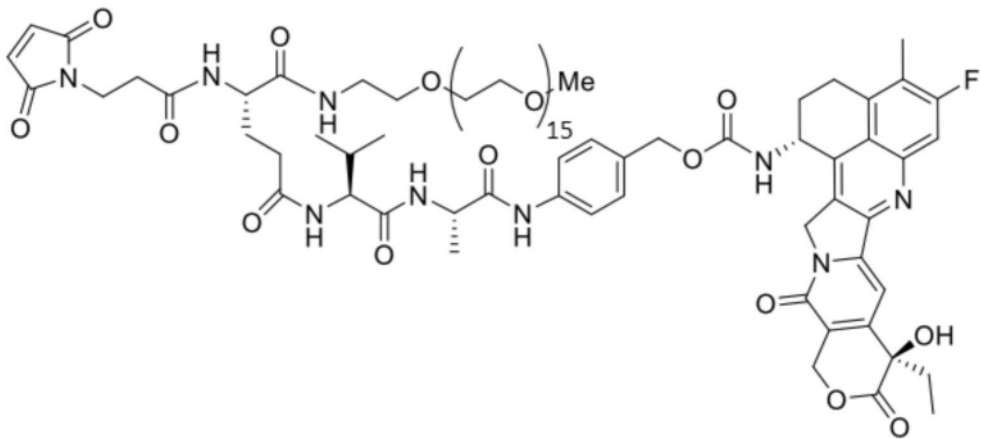
[0080] 在一个实施方案中,与依喜替康缀合的人源化Nectin-4抗体或抗体片段可被表征为包含具有一个或多个氨基酸残基(例如半胱氨酸残基、谷氨酰胺残基)的与人Nectin-4多肽特异性结合的抗体,该一个或多个氨基酸残基通过间隔子(Y)用包含以下结构的接头-依喜替康分子官能化:



[0081]

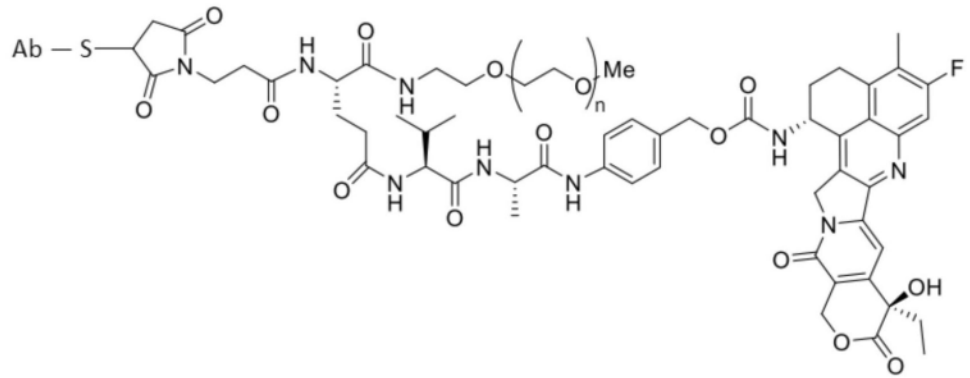
[0082] 间隔子 (Y) 可被指定为或包括经取代或未经取代的烷基或杂烷基链, 任选地其中 Y 的链长为 2-100 个原子、2-40 个原子, 任选地 2-30 个、2-20 个、4-40 个、4-30 个或 4-20 个原子, 任选地其中一个或多个原子可以不是碳, 例如是氧、硫、氮或其它原子, 任选地其中链的任何碳被烷氧基、羟基、烷基羰氧基、烷基-S-、硫醇、烷基-C(O)S-、胺、烷基胺、酰胺或烷基酰胺取代。例如, Y 可包括一个或多个环氧乙烷单体, 任选地 Y 包括聚环氧乙烷部分, 任选地 Y 包括结构 $-(CH_2CH_2O)_x-$, 其中 x 为 1 至 24, 任选地为 1 至 12, 任选地为 1 至 8, 任选地为 1 至 6。

[0083] 在一些方面, 提供了具有以下结构的接头-依喜替康分子:

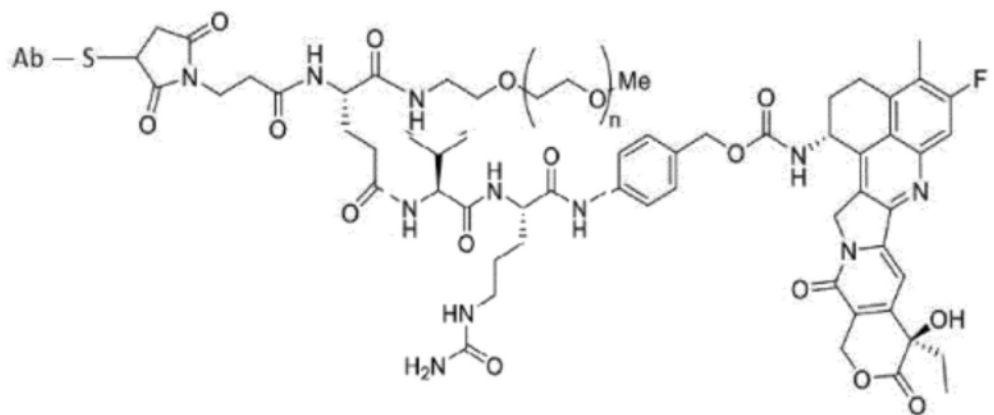


[0084]

[0085] 在某些实施方案中, 提供了结合人 Nectin-4 多肽的免疫缀合物, 其中该免疫缀合物由下式中的任一者表示:

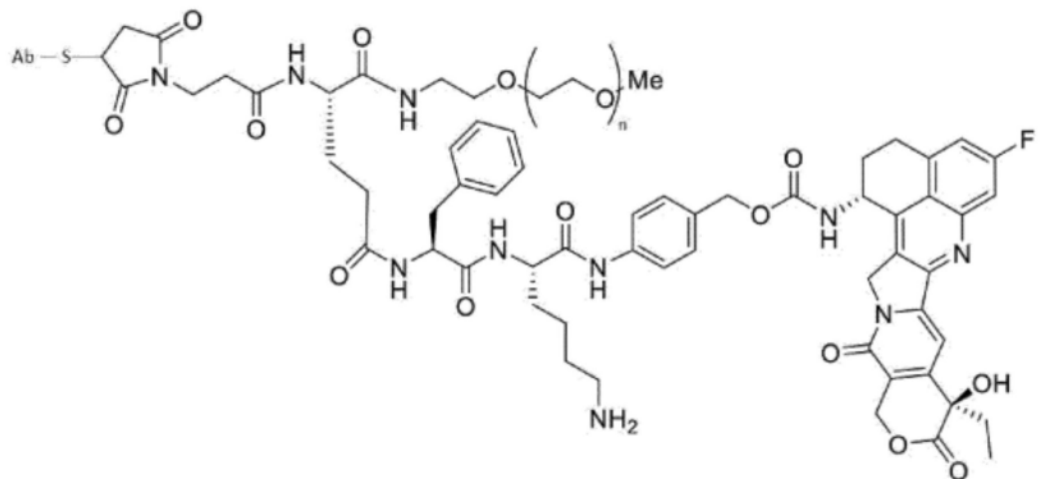


或



[0086]

或

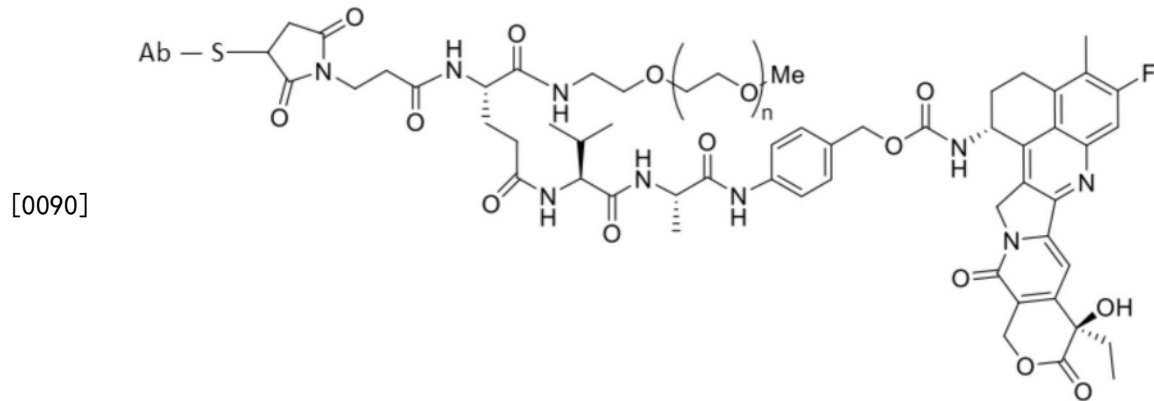


[0087] 其中n为1-15、5-15、5-23(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23);并且

[0088] 其中Ab是特异性结合人Nectin-4多肽的抗体或其抗体片段,任选地其中该抗体或抗体片段包含:与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少60%、任选地至少70%、任选地80%或任选地90%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:19、47、69或77;以及与选自由以下组成

的组的氨基酸序列至少60%、任选地至少70%、任选地80%或任选地90%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:20、65、70或78。S可被指定为抗体 (Ab) 的半胱氨酸残基的原子。

[0089] 在一个实施方案中,提供了结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物,其中该免疫缀合物由下式表示:



[0091] 其中Ab是特异性结合人Nectin-4多肽的抗体或其抗体片段。在一个实施方案中,n为15,并且该免疫缀合物的特征在于DAR介于6和8之间,任选地其中DAR为6,任选地其中DAR为8;并且其中S是抗体 (Ab) 的半胱氨酸残基的原子。在一个实施方案中,该Ab包含:重链可变区 (VH),该重链可变区包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列;和轻链可变区 (VL),该轻链可变区包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列,任选地其中该抗体或抗体片段包含:重链,该重链包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列;和轻链,该轻链包含SEQ ID NOS:78的氨基酸序列。

[0092] 在一个方面,与现有的抗Nectin-4 ADC疗法 (例如与澳瑞他汀;维汀-恩弗妥单抗缀合的抗Nectin-4抗体或抗体片段) 相比,该治疗显示出改善的功效和/或改善的 (更低的) 药物抗性。在一个方面,提供了一种在对其有需要的个体中治疗和/或预防癌症和/或杀死肿瘤细胞的方法,其中该治疗包括以每月1到2次的频率 (例如每两周一次、每三周一次或每四周一次) 施用2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次或10次或更多次与喜树碱衍生物 (例如依喜替康或SN-38分子) 缀合的Nectin-4结合剂。

[0093] 还提供了一种使用任选地与细胞毒性药物部分缀合的抗体、其片段在对其有需要的个体中治疗或预防疾病 (例如癌症) 的方法。在一个实施方案中,将任选地与细胞毒性药物部分缀合的该抗体或片段以足以杀死Nectin-4表达性肿瘤细胞的量和频率施用于患有癌症的个体。在一个实施方案中,所述个体患有Nectin-4表达性肿瘤,任选地其中该肿瘤是HER-2表达性肿瘤或HER2-阴性肿瘤,例如尿路上皮癌、头颈部鳞状细胞癌或食道癌。在一个实施方案中,癌症或肿瘤是晚期复发性或转移性癌症,任选地是晚期复发性或转移性尿路上皮癌。在一个实施方案中,癌症或肿瘤是三阴性乳腺癌 (TNBC)。

[0094] 在一个方面,本文的治疗方法可用于患有Nectin-4表达性癌症的个体,而不管肿瘤细胞上的Nectin-4表达水平如何。

[0095] 在一个方面,本文的治疗方法可有利地用于其肿瘤细胞表达P-糖蛋白 (Pgp) 的个体。

[0096] 在一个方面,本公开的治疗方法可有利地用于已经接受过用化疗剂 (例如,由P-糖蛋白 (Pgp) 转运的化疗剂、铂剂 (例如,奥沙利铂、顺铂、卡波铂、奈达铂、菲铂、吡铂、沙铂)、紫杉烷 (例如,紫杉醇 (Taxol™) 和多西他赛 (Taxotere™)) 进行的先前治疗的个体。

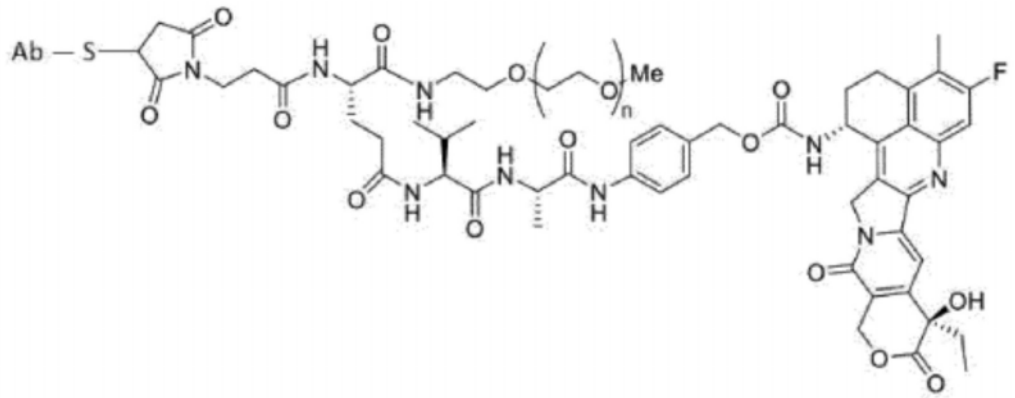
[0097] 本公开的抗Nectin-4抗体提供的增加的抗肿瘤效力和更大的治疗窗口(例如,特别是与喜树碱衍生物缀合时)提供了在患有肿瘤的个体中改善治疗结果的可能性,这些肿瘤对用包含抗HER2剂的组合物(例如,曲妥珠单抗(trastuzumab),包含曲妥珠单抗的ADC)或者对用包含另一种抗Nectin-4剂的组合物(例如,包含恩弗妥单抗的ADC;维汀-恩弗妥单抗)的治疗具有抗性、无应答或在该治疗后已进展。改善的治疗窗口提供了与其它剂(特别是化疗剂和/或抗HER2剂)组合治疗的可能性。

[0098] 在一方面,本文的治疗方法可有利地用于其肿瘤或癌症具有抗性(即对用包含抗HER2抗体的组合物(例如,曲妥珠单抗;包含曲妥珠单抗的ADC)或包含另一种抗Nectin-4剂的组合物(例如,包含恩弗妥单抗的ADC;维汀-恩弗妥单抗)进行的治疗无应答或在该治疗后已进展)的个体。

[0099] 在本文的实施方案的一个方面,该个体已经接受过放射疗法、手术、化疗和/或用生物剂治疗的先前治疗。

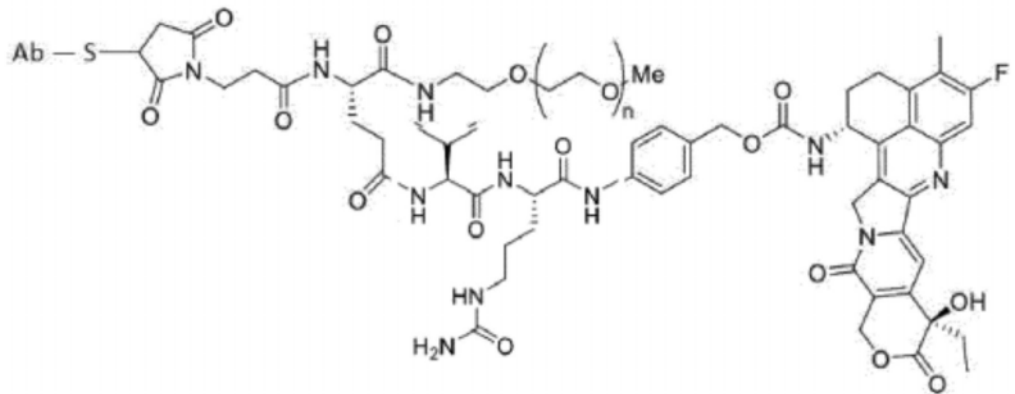
[0100] 在本文的实施方案的一个方面,个体已经接受过抗Nectin-4剂、任选地包含除拓扑异构酶抑制剂之外的细胞毒性部分的抗Nectin-4剂(例如维汀-恩弗妥单抗)的先前治疗。

[0101] 在本文的实施方案的一个方面,提供了在对其有需要的个体中治疗癌症、杀死肿瘤细胞和/或将细胞毒性剂递送至瘤的方法,该方法包括向已经接受过与澳瑞他汀,任选地维汀-恩弗妥单抗缀合的Nectin-4结合剂的先前治疗的个体施用治疗有效量的结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物,其中该免疫缀合物由下式中的任一者表示:



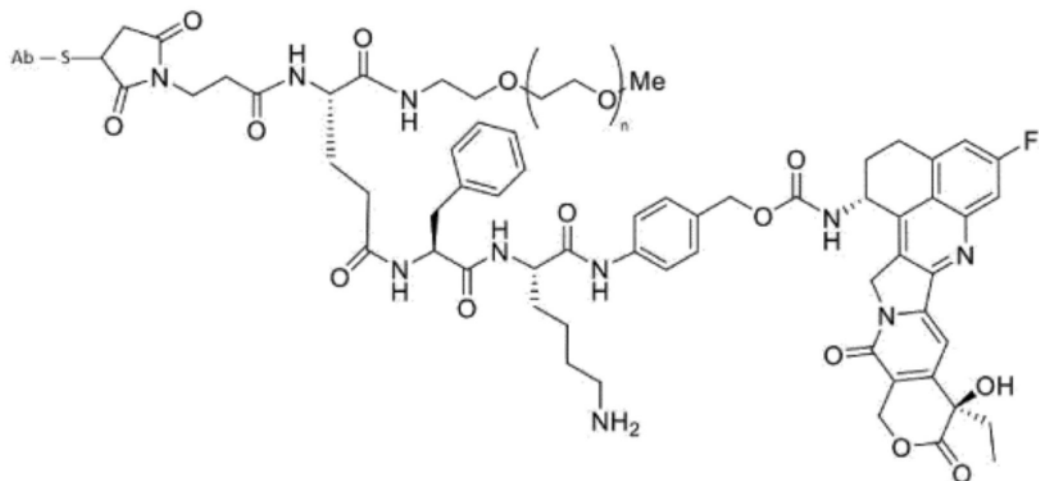
或

[0102]



或

[0103]



[0104] 其中n为5-23,任选地n为7-15,任选地n为15,并且其中Ab是特异性结合人Nectin-4多肽的抗体或其抗体片段。任选地,免疫缀合物的特征在于DAR介于6和8之间,任选地其中DAR为6,任选地其中DAR为8。

[0105] 在一个方面,本发明提供了治疗方法,这些治疗方法可用于以较低或低于常规抗Nectin-4 ADC所用剂量的剂量介导个体中的抗肿瘤作用,例如,小于3mg/kg体重、小于1.25mg/kg体重、小于1mg/kg体重、小于125mg固定剂量。

[0106] 在一个方面,本公开的治疗方法可用于患有现有神经病、糖尿病或高血糖、心功能不全、眼部病变的个体。

[0107] 在一个方面,本公开的治疗方法可用于患有Nectin-4表达性癌症的个体,该癌症的特征在于Nectin-4多肽的低或中等水平的肿瘤细胞表达(例如,Nectin-4多肽在肿瘤细胞膜处的表达)。

[0108] 在本文的任何实施方案中,与细胞毒性剂缀合的抗Nectin-4抗体与另一种细胞毒性剂(例如,化疗剂、由P-糖蛋白(Pgp,人MDR1基因的产物)转运的化疗剂、铂剂、紫杉烷)组合使用,其中另外的细胞毒性剂与缀合至细胞毒性剂的抗Nectin-4抗体分开施用。

[0109] 在本发明的另一个方面,提供了药物组合物和试剂盒,该药物组合物和试剂盒包含任选地与细胞毒性药物部分缀合的抗Nectin-4抗体或抗体片段,以及通常可以是促进组合物的调配、递送、稳定性或其它特性的活性成分或非活性成分(例如,各种载体)的一种或多种附加成分。

[0110] 在本文提供的本发明的描述中将更加充分地描述这些方面,并且另外的方面、特征和优点将是显而易见的。

附图说明

[0111] 图1示出了SUM190人乳腺癌肿瘤细胞表面的HER2和Nectin-4多肽的表达水平,如通过FACS所确定(MFI:荧光强度平均值)。SUM190肿瘤细胞以低至中等水平表达HER2(中值荧光单位为1777)并以低水平表达Nectin-4(中值荧光单位为991)。

[0112] 图2示出了SUM185人乳腺癌肿瘤细胞表面的HER2和Nectin-4多肽的表达水平,如通过FACS所确定(MFI:荧光强度平均值)。SUM185细胞以中等至高水平表达HER2(中值荧光单位为2880)并以高水平表达Nectin-4(中值荧光单位为4326)。

[0113] 图3A示出了5E7抗体以及同种型对照抗体(IC)对人乳腺癌细胞的杀伤,该5E7抗体与喜树碱类似物Dxd(通过实施例9中示出的GGFG-Dxd接头)或依喜替康(通过实施例9中示出的(PEG(8U)-Val-Ala-PAB-依喜替康)接头)缀合,全部以相等的药物/抗体比(DAR=8),并且与V结构域结合Enhertu™(曲妥珠单抗德卢替康(抗HER2))比较。图3B示出了“5E7-依喜替康”(缀合至实施例9中示出的依喜替康接头(PEG(8U)-Val-Ala-PAB-依喜替康)的5E7)在导致HER-2和Nectin-4表达性SUM185、SUM190、MDA-MB-468(TNBC)人肿瘤细胞和MC38(结肠癌)和B16F10(黑色素瘤)鼠肿瘤细胞的死亡方面的功效,以及关于5E7-依喜替康导致细胞死亡的能力的EC50值。

[0114] 图4示出了在人乳腺癌小鼠模型中,与相同剂量的恩弗妥单抗、N41和同种型对照抗体(IC)相比,3mg/kg单剂量的呈喜树碱ADC形式的5E7抗体的功效。每种抗体以相等的药物/抗体比(DAR=8)与相同的喜树碱类似物(Dxd)和含有四肽的接头(GGFG)缀合。仅5E7能够有效地控制肿瘤生长。

[0115] 图5示出了与Padcev™(维汀-恩弗妥单抗)(以DAR=4缀合至澳瑞他汀化合物MMAE的恩弗妥单抗)和Enhertu™相比,5E7抗体以相对高的水平杀伤表达Nectin-4的SUM185人乳腺癌细胞。这种设置用作抗HER2抗性的模型。

[0116] 图6A和图6B示出了如通过流式细胞术确定的,抗Nectin-4抗体5E7分别在大鼠和食蟹猴Nectin-4表达性CHO细胞系上的结合。

[0117] 图7A和图7B示出了人Nectin-4蛋白的结构,其中取代以着色显示;指示了对应于突变体7(7A)和7bis(7B)中被取代的C1结构域残基的白色区域。

[0118] 图8A和图8B示出了人Nectin-4蛋白的结构的几个视图,其中取代以着色显示;指示了对应于突变体1、2、3、4、5、6、7、8和9中被取代的残基的白色区域。

[0119] 图9A、图9B和图9C示出了在用ADC处理的小鼠中肿瘤生长随时间(肿瘤植入后的天数)的演变。图9A和图9B示出了在相同DAR下通过静脉注射与相同接头-有效载荷缀合的不同抗-nectin-4抗体(5E7或6A7),用3mg/kg体重的剂量进行的治疗。图9C示出了用10mg/kg体重的剂量通过静脉注射与接头缀合的抗体5E7进行的治疗,这些接头设计成在接头切割时释放Dxd或依喜替康。

[0120] 图10A示出了用Padcev™(维汀-恩弗妥单抗)、缀合至Dxd的抗体5E7或缀合至依喜替康的5E7处理的细胞的发光(指示细胞活力)。这些细胞是内源性表达MDR1 p-糖蛋白并且经工程化以表达Nectin-4的MC-38细胞。具有依喜替康作为有效负载的ADC在这种药物抗性设置中高度有效地降低细胞活力。图10B示出了在存在或不存在Pgp抑制剂环孢素的情况下,以150nM ADC并归一化成对照抗体,用Padcev™(维汀-恩弗妥单抗)、缀合至Dxd的抗体5E7或缀合至依喜替康的5E7处理的MC38细胞的肿瘤生长(曲线下面积),表明了Padcev™和缀合至Dxd的抗体5E7的抗肿瘤活性受到Pgp的负面影响。

[0121] 图11和图12示出了以3mg/kg剂量在小鼠体内评估游离毒素和ADC的结果。图11中示出了IC(游离毒素)的结果。图12中示出了ADC的结果。

[0122] 图13示出了抗Nectin-4 ADC在小鼠中的体内抗肿瘤功效和ADC的血浆浓度随时间的结果。左上图示出了PBS没有阻止肿瘤体积的增加。右上图示出了1mg/kg剂量的ADC显示出强抗肿瘤功效。下图示出了血浆中ADC随时间的浓度。

[0123] 图14示出了大鼠中ADC的体内血浆浓度。图14A示出了3mg/kg剂量(上图)和10mg/kg剂量(下图),并且图14B示出30mg/kg剂量的结果。

[0124] 图15示出了非人灵长类动物中ADC的体内血浆浓度。图15A示出了3mg/kg剂量(上图)和10mg/kg剂量(下图),并且图15B示出30mg/kg剂量的结果。

[0125] 表15示出了在本申请中公开的核酸和氨基酸序列。

具体实施方式

[0126] 定义

[0127] 如本说明书中所用,“一个”或“一种”可意指一个(种)或多个(种)。如权利要求中所用,当与词语“包含”结合使用时,词语“一个”或“一种”可意指一个(种)或超过一个(种)。如本文所用,“另一个”可意指至少第二个或更多。

[0128] 当使用“包括”时,这可以任选地由“基本上由...组成”或“由...组成”替换。

[0129] “Nectin-4”和“Nectin-4多肽”是指由NECTIN4基因(参见Uniprot登录号Q96NY8)或由此类基因制备的cDNA编码的蛋白质或多肽。任何天然存在的同种型、等位基因或变体均涵盖在术语Nectin-4多肽中(例如,与SEQ ID NO:1或与其至少100个、200个、300个、400个或500个氨基酸残基的连续序列95%、98%或99%相同的Nectin-4多肽)。典型的人Nectin-4(异构体1)的510个氨基酸残基序列,包含31个氨基酸信号肽,如下所示:

MPLSLGAEMW GPEAWLLLLL LLASFTGRCP AGELETSVWV
 TVVLGQDAKL
 PCFYRGDSGE QVGQVAWARV DAGEGAQELA LLHSKYGLHV
 SPAYEGRVEQ
 [0130] PPPRNPLDG SVLLRNAVQA DEGEYECRVS TFPAGSFQAR LRLRVLPPL
 PSLNPGPALE EGQGLTLAAS CTAEGSPAPS VTWDTEVKGT TSSRSFKHSR
 SAAVTSEFHL VPSRSMNGQP LTCVVSHPGL LQDQRITHIL HVSFLAEASV
 RGLDQNLWH IGREGAMKLC LSEGQPPPSY NWTRLDGPLP
 SGVRVDGDTL
 GFPLTTEHS GIYVCHVSNE FSSRDSQVTV DVLDPQEDSG KQVDLVSASV
 VVVGVIAALL FCLLVVVVVL MSRYHRRKAQ QMTQKYEEEL
 TLTRENSIRR
 [0131] LSHHTDPRS QPEESVGLRA EGHPDSLKDN SSCSVMSEEP EGRSYSTLTT
 VREIETQTEL LSPGSGRAEE EEDQDEGIKQ AMNHFVQENG TLRKPTGNG
 IYINGRGHLV (SEQ ID NO: 1)。

[0132] SEQ ID NO:1对应于UniProt KB标识符Q96NY8-1,其公开内容通过引用并入本文。

[0133] 本公开的某些方面提供了与人Nectin-4或其同源物结合的抗Nectin-4抗体,该同源物包括但不限于哺乳动物Nectin-4蛋白和来自其它物种(例如非人灵长类动物,食蟹猴)的Nectin-4直系同源物。

[0134] 术语“HER2”(也被称为HER2/neu和ErbB-2)代表“人表皮生长因子受体2”。其包含HER2的变体和同种型。

[0135] 术语“免疫缀合物”和“抗体缀合物”可互换使用,并且是指与另一种分子(例如,喜树碱衍生物、依喜替康分子、SN-38分子)缀合的抗原结合剂,例如抗体结合多肽或抗体。当免疫缀合物包含与治疗剂(例如,细胞毒性剂或抗癌剂)缀合的抗原结合剂时,免疫缀合物也可称为“抗体药物缀合物”或“ADC”。细胞毒性剂的示例包括喜树碱类、紫杉烷类、蒽环类、喜树碱类、埃博霉素类、丝裂霉素类、康普瑞汀类、长春花生物碱类、氮芥类、美登木素类、卡奇霉素类(calicheamycins)、倍癌霉素类、微管溶素类、尾海兔素类和澳瑞他汀类、烯二炔类、吡咯并苯二氮卓类和乙烯亚胺类。

[0136] 如本文所使用的,“治疗(treatment和treating等)”通常意指获得期望的药理学和生理学效果。就预防或部分预防疾病、其症状或病症而言,所述效果可以是预防性的和/或就疾病、病症、症状或归因于疾病的副作用的部分或完全治愈而言可以是治疗性的。如本文所用的术语“治疗”涵盖对哺乳动物、特别是人的疾病的任何治疗,并且包括:(a)预防疾病在可能易患该疾病但尚未诊断为患有该疾病的受试者中发生,诸如预防性早期无症状干预;(b)抑制疾病,例如阻止其发展;或缓解疾病,例如引起疾病和/或其症状或病状的消退,诸如损伤的改善或补救,例如在已经被诊断为患有该疾病的受试者中。任选地,治疗可以引起(例如,可以表征为引起的方法)肿瘤负荷的减少、病变的大小和/或数量的减少、癌症进展的减少或延迟(例如,无进展生存期增加)、癌症转移的延缓或预防和/或增加生存期。任

选地,治疗可以引起或提供(例如,可以表征为引起或提供的方法)受试者的稳定疾病、部分应答或完全应答,例如根据标准化标准,任选地RECIST标准。

[0137] 每当提及Nectin-4结合剂(例如抗体或抗体片段、免疫缀合物)的“癌症治疗”等时,这都包括:

[0138] (a)一种治疗癌症的方法,所述方法包括以下步骤:以允许治疗癌症的剂量(治疗有效量),任选地如本文规定的剂量(量)向需要这种治疗的个体、哺乳动物、尤其是人施用Nectin-4结合剂(用于至少一种治疗);

[0139] (b)Nectin-4结合剂在治疗癌症中的用途;

[0140] (c)Nectin-4结合剂,其用于治疗癌症(尤其在人中);

[0141] (d)Nectin-4结合剂在制备用于治疗癌症的药物制剂中的用途;

[0142] (e)一种使用Nectin-4结合剂制备用于治疗癌症的药物制剂的方法,所述方法包括将Nectin-4结合剂与药学上可接受的载体混合;

[0143] (f)一种药物制剂,其包括有效剂量的适合于治疗癌症的Nectin-4结合剂;

[0144] (g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)的任意组合,符合在提交本申请的国家允许授予专利的主题。

[0145] 如本文所使用的,术语“活检”被定义为出于检查目的,诸如为了确立诊断而去除组织。活检类型的示例包括通过施加抽吸,诸如经由附接至注射器的针;-通过仪器去除组织碎片;-通过经由内窥镜用适当的器械去除;-通过手术切除,诸如整个病灶的手术切除;等。

[0146] 如本文所用,术语“抗体”是指多克隆抗体和单克隆抗体。根据重链中的恒定结构域的类型,抗体被归属于五种主要类别之一:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。这些中的若干个进一步分为亚类或同种型,诸如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等。示例性免疫球蛋白(抗体)结构单元包括四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链构成,每对具有一个“轻”链(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每个链的N端限定主要负责抗原识别的约100至110个或更多个氨基酸的可变区。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别是指这些轻链和重链。与不同类别的免疫球蛋白相对应的重链恒定结构域分别被称为“ α ”、“ δ ”、“ ϵ ”、“ γ ”和“ μ ”。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。IgG是本文所采用的抗体的示例性类别,因为它们是生理情况下最常用的抗体并且因为它们在实验室环境中最容易制备。任选地,该抗体是单克隆抗体。抗体的特定示例是人源化、嵌合、人类或另外人适宜性的抗体。“抗体”还包括任何本文所述的抗体的任何片段或衍生物。

[0147] 抗体中负责抗原结合的氨基酸残基也可以被称为高变区。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如,轻链可变结构域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变结构域中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat等人,1991)和/或来自“高变环”的那些残基(例如,轻链可变结构域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变结构域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia和Lesk,J.Mol.Biol 1987;196:901-917)或用于确定负责抗原结合的必需氨基酸的类似系统。通常,该区域中的氨基酸残基的编号通过Kabat等人,出处同上中所述的方法执行。诸如“Kabat位置”、“如Kabat中的可变结构域残基编号”和“根据Kabat”之类的短语在本文中是指用于重链可变结构域或轻链可变结构域的该编号系统。使用Kabat编号系统,肽

的实际线性氨基酸序列可包含与可变结构域的FR或CDR的缩短或向其中的插入相对应的更少或附加氨基酸。例如,重链可变结构域可包含在CDR H2的残基52之后的单氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)和在重链FR残基82之后插入的残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。可通过在同源性区域处对给定抗体的序列与“标准”Kabat编号序列进行比对来确定该抗体的残基的Kabat编号。

[0148] 术语“特异性结合”意指抗体可以优选地在竞争性结合测定中与结合配偶体,例如Nectin-4结合,如使用蛋白质、其中的表位的重组形式,或存在于隔离的靶细胞的表面上的天然蛋白质所评估的。用于确定特异性结合的竞争性结合测定和其它方法是本领域众所周知的。例如结合可以通过放射性标记、物理方法(如质谱法)或使用例如细胞荧光分析(例如FACScan)检测的直接或间接荧光标记来检测。结合高于对照非特异性药剂所见的量表明所述药剂与靶标结合。

[0149] 当抗体被称为与特定单克隆抗体“竞争”时,这意味着抗体在使用重组分子(例如,Nectin-4)或表面表达的分子(例如,Nectin-4)的结合测定中与单克隆抗体竞争。例如,如果在结合测定中测试抗体降低具有SEQ ID NO:19中任一个的重链可变区和SEQ ID NO:20的相应轻链可变区的抗体与Nectin-4多肽或Nectin-4表达性细胞的结合,则抗体被称为分别与此类抗体“竞争”。

[0150] 术语“内化”可与“细胞内内化”互换使用,是指与将分子从细胞的细胞外表面易位至细胞的细胞内表面的过程相关的分子、生物化学和细胞事件。负责分子的细胞内内化的过程为人们所熟知,并且可尤其涉及细胞外分子(诸如激素、抗体和有机小分子);膜相关分子(诸如细胞表面受体);与细胞外分子(例如,与跨膜受体结合的配体或与膜相关分子结合的抗体)结合的膜相关分子的复合物的内化。因此,“诱导和/或增加内化”包括其中细胞内内化启动和/或细胞内内化的速率和/或程度增加的事件。

[0151] 如本文所用,术语“亲和力”是指抗体与表位结合的程度。抗体的亲和力由解离常数 K_d 给出,定义为 $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$,其中 $[Ab-Ag]$ 是抗体-抗原复合物的摩尔浓度, $[Ab]$ 是未结合抗体的摩尔浓度, $[Ag]$ 是未结合抗原的摩尔浓度。亲和力常数 K_a 由 $1/K_d$ 定义。用于确定单克隆抗体的亲和力的方法可以在以下参考文献中找到:Harlow等人,《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港,纽约,1988);Coligan等人(编者),《免疫学实验指南(Current Protocols in Immunology)》,格林出版协会和威立国际科学出版社(Greene Publishing Assoc.and Wiley Interscience),纽约,(1992,1993)以及Muller,《酶学方法(Meth.Enzymol.)》,第92卷:第589-601页(1983年),这些参考文献全文以引用方式并入本文。本领域众所周知的用于确定单克隆抗体的亲和力的一种标准方法是使用表面等离子共振(SPR)筛选(如通过用BIAcore™SPR分析装置进行分析)。

[0152] 在本文的上下文中,“决定簇”是指多肽上相互作用或结合的位点。

[0153] 术语“表位”是指抗原决定簇,并且是抗体所结合的抗原上的区或区域。蛋白质表位可包含直接参与结合的氨基酸残基以及被特异性抗原结合抗体或肽有效封闭的氨基酸残基,即,抗体的“足迹”内的氨基酸残基。其是可与例如抗体或受体组合的复合抗原分子上的最简单形式或最小结构区域。表位可为线性的或构象/结构的。术语“线性表位”被定义为由线性氨基酸序列上连续的氨基酸残基构成的表位(一级结构)。术语“构象或结构表位”被

定义为由并不都连续并因此代表通过分子折叠而彼此接近的线性氨基酸序列的分开部分的氨基酸残基构成的表位(二级、三级和/或四级结构)。构象表位取决于3维结构。因此术语“构象”通常可与“结构”互换使用。

[0154] 术语“试剂(agent)”在本文中用于表示化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子或由生物材料制备的提取物。术语“治疗剂”是指具有生物活性的试剂。

[0155] 术语“Fc结构域”、“Fc部分”和“Fc区”是指抗体重链的C末端片段,例如,来自人 γ (γ)重链的约氨基酸(aa)230至约aa 450,或其其它类型的抗体重链中的对应序列(例如,人抗体的 α 、 δ 、 ϵ 和 μ),或其天然存在的同种异型。除非另外指明,否则在整个本公开中使用免疫球蛋白的公认Kabat氨基酸编号(参见Kabat等人,(1991),《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》(Sequences of Protein of Immunological Interest),第5版,美国公共卫生署(United States Public Health Service),国立卫生研究院(National Institutes of Health),马里兰州贝塞斯达(Bethesda,MD))。

[0156] 如本文所用,所谓“框架”或“FR”残基意指除被定义为CDR的那些区域之外的抗体可变结构域的区域。每个抗体可变结构域框架可被进一步细分为由这些CDR分开的连续区域(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0157] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学上纯的”是指基本上或实质上不含如在其天然状态下发现的通常与之相伴的组分。通常使用分析化学技术诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法来确定纯度和均质性。作为存在于制剂中的主要物质的蛋白质基本上被纯化。

[0158] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0159] 术语“重组”在参考例如细胞或核酸、蛋白质或载体使用时,指示该细胞、核酸、蛋白质或载体已通过引入异源核酸或蛋白质或变更天然核酸或蛋白质来修饰,或该细胞衍生于如此修饰的细胞。因此,例如,重组细胞表达在细胞的天然(非重组)形式中未发现的基因,或表达在其他情况下异常表达、低表达或根本不表达的天然基因。

[0160] 在本文的上下文内,“结合”多肽或表位的术语抗体指定特异性和/或亲和性地结合所述决定簇的抗体。

[0161] 术语“同一性”或“相同”在两个或更多个多肽的序列之间的关系中使用是指多肽之间的序列相关性的程度,如通过两个或更多个氨基酸残基的链之间的匹配数所确定。“同一性”度量通过特定数学模型或计算机程序(即,“算法”)解决的具有空位对齐(如果有的话)的两个或更多个序列中的更小序列之间的相同匹配的百分比。可易于通过已知方法计算相关多肽的同一性。此类方法包括但不限于以下文献中描述的那些:《计算分子生物学》(Computational Molecular Biology),Lesk,A.M.编辑,牛津大学出版社(Oxford University Press),纽约(New York),1988;《生物计算:信息学和基因组计划》(Biocomputing:Informatics and Genome Projects),Smith,D.W.编辑,学术出版社(Academic Press),纽约(New York),1993;“序列数据的计算机分析第1部分(Computer Analysis of Sequence Data,Part 1)”,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编辑,胡马纳出版社(Humana Press),新泽西州,1994年;“分子生物学中的序列分析(Sequence Analysis in

Molecular Biology)”, von Heinje, G., 学术出版社, 1987年;《序列分析引物》(Sequence Analysis Primer), Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编辑, M. 斯托克顿出版社 (M. Stockton Press), 纽约 (New York), 1991; 以及 Carillo 等人,《工业和应用数学会应用数学杂志》(SIAM J. Applied Math.), 第48卷第1073页 (1988年)。

[0162] 用于确定同一性的方法被设计为给出所测试的序列之间的最大匹配。确定同一性的方法在公开可用的计算机程序中有所描述。用于确定两个序列之间的同一性的计算机程序方法包含GCG程序包, 包含GAP (Devereux等人,《核酸研究 (Nucl. Acid. Res.)》, 第12卷第387页 (1984年); 威斯康星大学遗传学计算机小组 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin), 威斯康星州麦迪逊 (Madison, Wis.)、BLASTP、BLASTN和FASTA (Altschul等人,《分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.)》, 第215卷第403-410页 (1990年))。BLASTX程序可从美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 和其他来源(《BLAST手册 (BLAST Manual)》, Altschul等人, NCB/NLM/NIH贝塞斯达 (Bethesda), 马里兰州 (Md.) 20894; Altschul等人, 出处同上) 公开获得。熟知的Smith Waterman算法也可用于确定同一性。

[0163] 如本文所使用的,“烷基”是指包括完全饱和(无双键或三键)烃基的直链或支链烃链。烷基可以具有例如1至20个碳原子(无论其在本文何时出现,诸如“1至20”等数值范围是指在给定范围内的每个整数;例如,“1至20个碳原子”意味着烷基可以由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等组成,至多且包含20个碳原子,但本定义还涵盖了未指定数值范围的情况下术语“烷基”的出现)。化合物的烷基可以命名为“C₁-C₄烷基”或类似名称。仅举例来讲,“c₁-c₄烷基”指示在烷基链中存在一到四个碳原子,即烷基链选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。典型的烷基包含但是决不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基和己基。烷基可以是经取代的或未经取代的。

[0164] 如本文所使用的,术语“杂烷基”是指含有一个或多个杂原子的直链或支链烷基,即碳以外的元素(包含但不限于氧、硫、氮、磷)代替一个或多个碳原子。

[0165] 每当基团被描述为“经取代的”时,该基团被一个或多个指定的取代基取代。如果未指明取代基,则意味着所指明的“取代的”基团可以被单独并且独立地选自以下的一个或多个基团取代:烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、杂烷基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基、杂芳烷基、(杂脂环基)烷基、羟基、烷氧基、芳氧基、酰基、巯基、烷硫基、芳硫基、氰基、卤素、硫代羰基、氨基甲酰基、硫代氨基甲酰基、酰氨基、磺酰氨基、磺酰氨基、羧基、异氰酸根、硫氰酸根、异硫氰酸根、硝基、甲硅烷基、亚磺酰基、亚磺酰基、磺酰基、卤代烷基、卤代烷氧基、三卤代甲磺酰基、三卤代甲磺酰氨基、氨基、单-取代氨基和二-取代氨基,及其受保护的衍生物。

[0166] 在未指定取代基的数量(例如卤代烷基)的情况下,可以存在一个或多个取代基。例如,“卤代烷基”可以包含相同或不同的卤素中的一个或多个。作为另一示例,“C₁-C₃烷氧基苯基”可以包含含有一个、两个或三个原子的相同或不同烷氧基中的一个或多个。

[0167] 除非上下文另行明确指出,否则对具有特定编号的“化合物”或“式”的提及(例如,“化合物1”、“化合物2”、“式I”或“式II”)表示衍生自具有特定编号的化合物或式的所有化合物。化合物1,例如包含对化合物1a和1b的提及。

[0168] 产生抗体和抗体片段

[0169] 高变区、重链和轻链CDR、重链和轻链可变区以及包括它们的抗体(例如,全长抗体或抗体片段、多特异性抗原结合蛋白、嵌合抗原受体)将结合在细胞(例如肿瘤细胞)表面上表达的人Nectin-4。在一个实施方案中,抗体对Nectin-4的结合由单个抗原结合结构域或由两个相同的抗原结合结构域介导,任选地其中每个抗原结合结构域包含VH和VL结构域对。在一些实施方案中,提供了单个VH或VL可变结构域;此类结构域可例如掺入分别表达和产生的多肽中,并且然后可组合形成Nectin-4结合结构域。

[0170] 当用于消除Nectin-4表达性肿瘤细胞的治疗中时,作为免疫缀合物或作为非缀合(“裸”)抗体(例如,任选地与单独施用的细胞毒性剂组合),Nectin-4结合抗体(例如,全长抗体、抗体片段)或包含此类抗体的蛋白质、缀合物或复合物可有利地抑制由Nectin-4介导的细胞间相互作用,例如,如通过评估Nectin-4表达性细胞的细胞簇形成(例如,在三维细胞培养系统中,通过评估肿瘤球状体形成或生长)和/或非锚定依赖性生长所确定的。当用于消除Nectin-4表达性肿瘤细胞的治疗中时,作为具有细胞毒性剂的免疫缀合物或作为与单独施用的细胞毒性剂组合的非缀合(“裸”)抗体,Nectin-4结合抗体可有利地能够使肿瘤对细胞毒性剂敏化,例如抗体可增强细胞毒性剂抑制肿瘤细胞的增殖或导致肿瘤细胞死亡的能力,例如抑制成簇(例如,成球状体)的肿瘤细胞的增殖或导致其死亡的能力,或抑制肿瘤细胞簇(例如,球状体)的形成或生长的能力。当作为免疫缀合物用于消除Nectin-4表达性肿瘤细胞的治疗中时,抗Nectin-4免疫缀合物在与如本文公开的细胞毒性分子缀合时可有利地能够引起Nectin-4表达性肿瘤细胞的死亡。

[0171] 表达Pgp的肿瘤细胞可具有对某些细胞毒性剂的降低的敏感性。可任选地使用表达Pgp的细胞(例如,肿瘤细胞)来测试抗体和细胞毒性剂(无论细胞毒性剂是否与抗体缀合)。

[0172] 肿瘤球状体通常对化疗较不敏感,部分是由于其结构提供的保护,也由于其较慢的增殖速率,因此肿瘤球状体可用于评估抗体或免疫缀合物的抗肿瘤作用。可测试抗体或免疫缀合物以浓度依赖性方式抑制球状体形成或破坏癌细胞球状体形成的能力。例如,可使用实时数字摄影来测试抗体或免疫缀合物改变不同癌细胞系中的球状体形成的能力。

[0173] 抗体或免疫缀合物可例如表征为能够将癌细胞维持为单细胞(或增加其维持),这些细胞可因此变得对细胞毒性剂(例如化疗)更敏感。促进将癌细胞维持为单细胞以增加对化疗的敏感性可通过在抗体或免疫缀合物的存在下单独或组合地以不同浓度添加不同的化疗剂(例如,多柔比星、顺铂、紫杉醇、喜树碱或喜树碱类似物)进行体外测试,任选地进一步与仅结合Ig样V结构域或Ig样C21或2型结构域的抗体或免疫缀合物进行比较。将癌细胞维持为单细胞以增加对化疗的敏感性还可以例如通过添加具有不同毒素的靶向Nectin-4的不同结构域的不同免疫缀合物进行体外测试,其中当抗体结合Nectin-4的VC1结构域时,化疗剂或ADC的IC50将较低,或者对于其中抗体结合Nectin-4的VC1结构域的ADC,用于控制肿瘤生长的剂量将较低。对化疗的敏感性可评估为细胞活力、细胞增殖或细胞毒性,例如使用不同的读出(诸如通过发光的CTG、使用Incucyte的汇合或胱天蛋白酶3/7或膜联蛋白V)来监测。在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体或抗体片段结合野生型人Nectin-4多肽,例如具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽,以及结合具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的修饰的人Nectin-4多肽(含有Ig样C21和2型结构域但缺乏Ig样V型结构域的Nectin-4蛋白)。任选地,抗体保留与缺乏Ig样V型结构域的多肽的部分结合,任选地其中相比于与野生型

Nectin-4蛋白的结合,抗体以降低的水平保留与缺乏Ig样V型结构域的Nectin-4蛋白的结合,例如其中降低的水平是与野生型Nectin-4的结合的5%-50%之间、任选的5%-30%之间、任选的5%-25%之间、任选的5%-15%之间。任选地进一步,抗Nectin-4抗体不结合缺乏Ig样V型结构域和Ig样C21型结构域两者的Nectin-4多肽,例如具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的多肽。任选地,使用制备成表达Nectin-4多肽的细胞通过流式细胞术来评估结合,并且确定荧光强度水平(例如,MFI)。

[0174] 在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体或抗体片段不与人Nectin 1蛋白、人Nectin 2蛋白、人Nectin 3蛋白和人PVR蛋白中的任一者结合。相应的Nectin或PVR蛋白可被指定为在细胞表面处表达。

[0175] 在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体或抗体片段结合:

[0176] Nectin-4多肽,该多肽具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,和

[0177] Nectin-4多肽,该多肽具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列(相比于与SEQ ID NO:1的结合,任选地以降低的水平,任选地5%-50%之间的水平),其中抗Nectin-4抗体或抗体片段不结合以下中的任一种:

[0178] 具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的多肽,

[0179] 具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的多肽,

[0180] 具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的多肽,和

[0181] 具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的多肽。

[0182] 任选地进一步,抗Nectin-4抗体或抗体片段不结合具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的多肽。

[0183] 任选地进一步,抗Nectin-4抗体或抗体片段结合大鼠Nectin-4多肽(例如,SEQ ID NO:13的氨基酸序列)。

[0184] 在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体或抗体片段结合Nectin-4的VC1桥接结构域、表位或决定簇。

[0185] 在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体或抗体片段在选自A72、G73、S195、K197、S199、L150、S152、Q234和I236(参考SEQ ID NO:1)组成的组的1、2、3、4或5个或更多个残基处结合人Nectin-4。在一个实施方案中,抗Nectin-4抗原结合蛋白或抗体在选自K197、S199和Q234组成的组的1、2或3个残基、任选地残基K197和/或S199处结合人Nectin-4。在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体或抗体片段结合人Nectin-4的残基K197。在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体或抗体片段结合人Nectin-4的残基S199。在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体或抗体片段结合人Nectin-4的残基Q234。结合可以例如通过评估抗体或抗体片段与突变体Nectin-4多肽(例如,如在细胞表面处表达的)的结合是否已经降低或丧失来确定,该突变体Nectin-4多肽中的所述残基被不同残基取代。

[0186] 在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体或抗体片段能够结合Ig样V型结构域和Ig样C21型结构域两者,例如结合Ig样V型结构域上的决定簇或表位和Ig样C21型结构域上的决定簇或表位。

[0187] 在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体或抗体片段保留与包含Ig样C21型结构域但缺乏Ig样V型结构域的修饰的Nectin-4多肽(例如,缺乏SEQ ID NO:3的全部或部分氨基酸序列的Nectin-4多肽)的至少部分结合。部分结合可以被表征为保留结合,但是相比于与具

有SEQ ID NO:1的残基的氨基酸序列的野生型人Nectin-4多肽的结合,以降低的水平结合(例如,如通过流式细胞术评估的)。Nectin-4多肽可以被指定为在细胞(例如,被制备成表达多肽的宿主细胞)的表面处表达。

[0188] 抗体可以通过本领域已知的多种技术产生。通常,它们是通过用包括Nectin-4多肽(优选地人Nectin-4多肽)的免疫原对非人动物(优选地小鼠)进行免疫而产生的。Nectin-4多肽可包含人Nectin-4多肽的全长序列或其片段或衍生物,通常是免疫原性片段,即,包含暴露于表达Nectin-4多肽的细胞的表面上的表位(例如,由5E7抗体识别的表位)的多肽的一部分。Nectin-4多肽可以被指定为包含VC1桥接结构域或其片段或子序列或由其组成。此类片段通常含有成熟多肽序列的至少约7个连续氨基酸,甚至更优选地其至少约10个连续氨基酸。片段通常基本上衍生自受体的细胞外结构域。在一个实施方案中,免疫原包括脂质膜中的野生型人Nectin-4多肽,通常位于细胞表面。在一个具体实施方案中,该免疫原包含完整细胞,特别是完整人细胞,任选地其经过处理或裂解。在另一个优选的实施方案中,多肽是重组Nectin-4多肽。在具体实施方案中,免疫原包括完整的Nectin-4表达性细胞。

[0189] 用抗原免疫非人哺乳动物的步骤可以以本领域众所周知的任何方式进行,用于刺激小鼠中抗体的产生(参见例如,E.Harlow和D.Lane,《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual.)》,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约(1988),该文献的全部公开内容以引用方式并入本文)。

[0190] 还可通过选择免疫球蛋白的组合文库来产生抗体,如例如(Ward等人,《自然》(Nature),341(1989),第544页,该文献的全部公开内容以引用方式并入本文)中所公开。

[0191] 本文提供了经修饰的人受体框架序列,其中可掺入抗体CDR,使得所得抗Nectin-4可变区在Nectin-4表达性细胞中具有高结合和内化效力。抗体的优点是在人体中的免疫原性低或降低,例如在施用于人后引起不希望的抗Nectin-4抗体定向免疫应答的能力或可能性较低。本公开的此类抗体的示例包括包含与L0、L1、L2或L3VL结构域组合的H0、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9或H10VH结构域的抗体。本公开的抗体的示例包括包含抗体H0+L0、H1+L0、H2+L0、H3+L0、H3+L1、H3+L2、H3+L3、H4+L1、H4+L2、H4+L3、H5+L1、H5+L2、H5+L3、H6+L1、H6+L2、H6+L3、H7+L1、H7+L2、H7+L3、H8+L1、H9+L1和H10+L1中任一种的VH和VL结构域对的抗体。

[0192] 在一个方面,与人Nectin-4多肽结合的抗体或抗体片段包括人来源(例如,衍生自人氨基酸序列)的VH和VL框架(例如,FR1、FR2、FR3和FR4)。在一个方面,抗体或抗体片段包含:HCDR1(重链CDR1),该HCDR1包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列SYWMH;和HCDR2(重链CDR2),该HCDR2包含如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列EIDPSDSYTNYNQKFKG;HCDR3(重链CDR3),该HCDR3包含如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列GYGNYGDY;LCDR1,该LCDR1包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列RSSKSLHNSGITYLY;LCDR2,该LCDR2包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列QMSNLAS;LCDR3,该LCDR3包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列AQNLELPWT。

[0193] 在一个实施方案中,抗体包含衍生自人亚组IGHV1-46(任选地以及IGHJ4,优选地IGHJ4*01)的重链框架,任选地IGHV1-46是IGHV1-46*01。在一个实施方案中,抗体包含衍生自人亚组IGKV2-28(任选地以及IGKJ,优选地IGKJ4*01)的轻链框架,任选地IGKV2-28是

IGKV2-28*01。

[0194] 抗体可进一步包含跨人重链和/或轻链框架的一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代,以例如增强抗体的亲和力、稳定性或其他性质。

[0195] 任选地,在任何实施方案中,抗体可被指定为除鼠亲本抗体(例如,具有SEQ ID NO:19和20的相应VH和VL的鼠亲本抗体)之外的抗体。

[0196] 任选地,人框架包含一个或多个突变(例如,回复突变)以引入存在于非人哺乳动物(例如,小鼠)中特定位置的残基。任选地,抗体的重链可变区的人框架在选自28、38、40、48、69、71、73或78的kabat位置处包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个突变。

[0197] 在本文任何实施方案的一个方面,Kabat重链位置28处的苏氨酸残基被苏氨酸残基取代。

[0198] 在本文任何实施方案的一个方面,Kabat重链位置38处的精氨酸残基被赖氨酸残基取代。

[0199] 在本文任何实施方案的一个方面,Kabat重链位置40处的丙氨酸残基被精氨酸残基取代。

[0200] 在本文任何实施方案的一个方面,Kabat重链位置48处的甲硫氨酸残基被异亮氨酸残基取代。

[0201] 在本文任何实施方案的一个方面,Kabat重链位置69处的甲硫氨酸残基被亮氨酸残基取代。

[0202] 在本文任何实施方案的一个方面,Kabat重链位置71处的精氨酸残基被亮氨酸残基取代。

[0203] 在本文任何实施方案的一个方面,Kabat重链位置73处的苏氨酸残基被赖氨酸残基取代。

[0204] 在本文任何实施方案的一个方面,Kabat重链位置78处的缬氨酸残基被苏氨酸残基取代。

[0205] 任选地,抗体的轻链可变区的人框架在选自2、8、11或64的kabat位置处包含一个、两个、三个或四个突变。

[0206] 在本文任何实施方案的一个方面,Kabat轻链位置2处的异亮氨酸残基被缬氨酸残基取代。

[0207] 在本文任何实施方案的一个方面,Kabat轻链位置8处的脯氨酸残基被丙氨酸残基取代。

[0208] 在本文的任何实施方案的一个方面,Kabat轻链位置11处的亮氨酸残基被天冬酰胺取代。

[0209] 在本文任何实施方案的一个方面,Kabat轻链位置64处的甘氨酸残基被丝氨酸残基取代。

[0210] 使用Kabat编号系统(Kabat等人(1991年)Sequences of Protein of Immunological Interest,第5版,United States Public Health Service,National Institute of Health,Bethesda,MD)描述本文VH和VL结构域中的位置。

[0211] 在一个方面,分离的抗Nectin-4人源化单克隆抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区与SEQ ID NO:37、39、41、43、45、47、49、51、53、55或57中任一者的

氨基酸序列具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性),该轻链可变区与SEQ ID NO:59、61、63或65中任一者的氨基酸序列具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性)。

[0212] 在一个方面,分离的抗Nectin-4人源化单克隆抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区与SEQ ID NO:47(H5)的氨基酸序列具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性),该轻链可变区包含SEQ ID NO:65(L3)的氨基酸序列。

[0213] 在一个实施方案中,提供了抗Nectin-4抗体,其包含:重链,该重链与包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的重链具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性);和轻链,该轻链与包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的轻链具有至少约80%的序列同一性(例如,至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,或100%的同一性)。

[0214] 可以制备对抗体进行编码的DNA并将其置于适当的表达载体中以转染到适当的宿主中。然后,将宿主用于重组产生抗体或其变体,如所述单克隆抗体的人源化形式、抗体的活性片段、包括抗体的抗原识别部分的嵌合抗体或包括可检测部分的形式。

[0215] 对本公开的单克隆抗体进行编码的DNA可以容易地分离,并且使用常规程序测序(例如,通过使用能够与对鼠抗体的重链和轻链进行编码的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。在一个方面,提供了对本文的任何实施方案的抗Nectin-4抗体或抗体片段的重链或轻链进行编码的核酸。一旦分离,就可将DNA置于表达载体中,然后将表达载体转染进宿主细胞诸如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞中(这些细胞原本不产生免疫球蛋白),以实现单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成。可以修饰此类DNA序列用于任何大量目的,例如用于对抗体进行人源化、产生片段或衍生物、或用于修饰抗体的序列,例如在抗原结合位点中,以优化抗体的结合特异性。在一个实施方案中,提供了对抗体的轻链和/或重链的进行编码的分离的核酸序列,以及包括(例如,在其基因组中)此类核酸的重组宿主细胞。对抗体进行编码的DNA在细菌中的重组表达是本领域众所周知的(参见例如,Skerra等人,《免疫学最新观点(Curr.Opinion in Immunol.,第5卷第256页(1993));和Pluckthun,Immunol.第130卷第151页(1992年))。

[0216] 抗体的片段和衍生物(其被本申请中使用的术语“抗体(antibody)”或“抗体(antibodies)”涵盖,除非另有说明或上下文明显矛盾)可以通过本领域已知的技术产生。“片段”包含完整抗体的一部分,通常为抗原结合位点或可变区。抗体片段的示例包括Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;任何抗体片段,其是具有由一个连续氨基酸残基的不间断序列组成的一级结构的多肽(本文中称为“单链抗体片段”或“单链多肽”);以及由抗体片段形成的多特异性(例如,双特异性)抗体。例如,多特异性蛋白可包含本文的任何实施方案的抗体的高变区(例如,VH和VL)和不同抗体(例如,结合除Nectin-4以外的感兴趣的抗原的抗体)的高变区(例如,VH和VL)。

[0217] 通常,本文提供的抗Nectin-4抗体对Nectin-4多肽(例如,本文实施例中产生的Nectin-4多肽)的亲合力在约 10^4 至约 $10^{11}M^{-1}$ (例如,约 10^7 至约 $10^{10}M^{-1}$)的范围内。例如,在特定方面,本公开提供了关于Nectin-4的平均解离常数(K_D)小于 $1 \times 10^{-7}M$ 的抗Nectin-4抗体,

如通过例如表面等离子共振 (SPR) 筛选 (诸如通过用BIAcore™SPR分析装置进行的分析) 所确定的。在更具体的示例性方面, 本公开提供了对Nectin-4的KD为约 1×10^{-7} M至约 1×10^{-10} M的抗Nectin-4抗体。

[0218] 抗体可例如通过不超过约 (即比其更好的亲和力) 200、150、100、80、70、60、40、30或25纳摩尔的平均KD来表征。KD可例如通过将重组产生的人Nectin-4蛋白固定在芯片表面上, 随后施用溶液形式的待测抗体来测定。在一个实施方案中, 方法进一步包括步骤(d): 从(b)选择能够与对照抗体竞争与Nectin-4结合的抗体。

[0219] 抗Nectin-4抗体可具有或不具有与人Fc γ 受体的实质性结合。在一个实施方案中, 抗Nectin-4抗体包含保留与人Fc γ 受体结合的人IgG1同种型的Fc结构域。在一个实施方案中, 抗Nectin-4抗体包含经修饰 (例如通过引入取代) 以增加与人Fc γ 受体 (例如CD16A) 的结合的人IgG1同种型的Fc结构域。在另一个实施方案中, 抗Nectin-4抗体可被制备成使得其不与人Fc γ 受体 (例如, CD16A、CD16B、CD32A、CD32B和/或CD64中的任何一个或多个) 实质性结合。此类抗体可以包括已知缺乏与Fc γ 受体的结合或与其结合低的各种重链的恒定区。另选地, 不包含 (或包含部分) 恒定区的抗体片段 (诸如F(ab')₂片段) 可用于避免Fc受体结合。可根据本领域已知的方法评估Fc受体结合, 包括例如在BIACORE测定中测试抗体与Fc受体蛋白的结合。此外, 通常可使用任何抗体IgG同种型, 其中Fc部分被修饰 (例如, 通过引入1个、2个、3个、4个、5个或更多个氨基酸取代) 以最大程度降低或消除与Fc受体的结合 (参见例如, WO 03/101485, 其公开内容以引用方式并入本文)。测定诸如评估Fc受体结合是本领域熟知的, 并描述于例如WO 03/101485中。沉默Fc IgG1抗体的示例是在IgG1Fc氨基酸序列中包含L234A和L235A突变的LALA突变体。Fc沉默突变的另一个示例是残基D265或D265和P329处的突变, 例如在IgG1抗体中用作DAPA (D265A, P329A) 突变 (US 6, 737, 056)。另一种沉默IgG1抗体包括残基N297处的突变 (例如, N297A、N297S突变), 其产生非糖基化/非糖基化抗体。其他沉默突变包括: 在残基L234和G237处的取代 (L234A/G237A); 在残基S228、L235和R409处的取代 (S228P/L235E/R409K、T、M、L); 在残基H268、V309、A330和A331处的取代 (H268Q/V309L/A330S/A331S); 在残基C220、C226、C229和P238处的取代 (C220S/C226S/C229S/P238S); 在残基C226、C229、E233、L234和L235处的取代 (C226S/C229S/E233P/L234V/L235A); 在残基K322、L235和L235处的取代 (K322A/L234A/L235A); 在残基L234、L235和P331处的取代 (L234F/L235E/P331S); 在残基234、235和297处的取代; 在残基E318、K320和K322处的取代 (L235E/E318A/K320A/K322A); 在残基处的取代 (V234A、G237A、P238S); 在残基243和264处的取代; 在残基297和299处的取代; 使得由EU编号系统定义的残基233、234、235、237和238包含选自PAAAP、PAAAS和SAAAS的序列 (参见WO2011/066501) 的取代。在一个实施方案中, 抗体在重链恒定区中具有位于选自以下组成的组的残基中的任何一个、两个、三个、四个、五个或更多个处的取代: 220、226、229、233、234、235、236、237、238、243、264、268、297、298、299、309、310、318、320、322、327、330、331和409 (重链恒定区中残基的编号根据Kabat的EU编号)。

[0220] 在此处使用的缩略符号中, 格式是: 野生型残基: 多肽中的位置: 突变残基, 其中残基位置根据Kabat的EU编号来表示。

[0221] 在具体的实施方案中, 提供了基本上结合与单克隆抗体5E7相同的表位或决定簇的抗体; 任选地, 该抗体包含抗体5E7的高变区。在本文的任何实施方案中, 抗体5E7可由氨

氨基酸序列和/或编码其的核酸序列表征。在一个实施方案中,单克隆抗体包含5E7的Fab或F(ab')₂部分。还提供了包含5E7的重链可变区的抗体或抗体片段。根据一个实施方案,抗体或抗体片段包含5E7的重链可变区的三个CDR。还提供了进一步包含5E7的可变轻链可变区或5E7的轻链可变区的CDR中的一个、两个或三个CDR的抗体或抗体片段。任选地,HCDR1、2、3和LCDR1、2、3序列可以被指定为所有(或各自独立地)是Kabat编号系统的序列、Chotia编号系统的序列、IMGT编号系统或任何其它适合的编号系统的序列。任选地,所述轻链或重链CDR中的任一个或多个轻链或重链CDR可包含一个、两个、三个、四个或五个或更多个氨基酸修饰(例如,取代、插入或缺失)。

[0222] 在一个方面,抗Nectin-4抗体或抗体片段包含与SEQ ID NO:19的VH结构域具有至少约60%、70%或80%的序列同一性、任选地至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性的VH结构域。在另一个方面,抗Nectin-4抗体包含与SEQ ID NO:20的VL结构域具有至少约60%、70%或80%的序列同一性、任选地至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性的V_L结构域。

[0223] VH和VL包含(例如,经修饰以掺入)人受体框架。在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体包括具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区的VH CDR1、CDR2和/或CDR3(例如,根据Kabat编号)。在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体包括具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区的VL CDR1、CDR2和/或CDR3(例如,根据Kabat编号)。在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体包含VH和VL,该VH包含具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区的Kabat CDR1、CDR2和/或CDR3,并且该VL包含具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区的Kabat CDR1、CDR2和/或CDR3。

[0224] 5E7 VH:

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGGLEW

[0225] IGEIDPSDSYTNYNQKFKGKATLTLDKSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCV
RGYGNYGDIWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 19)

[0226] 5E7VL:

DVVMVTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQ

[0227] LLIYQMSNLAGVLPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELP
WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 20)

[0228] 5E7CDR:

Kabat:	CDR-H1	SYWMH (SEQ ID NO: 21)
	CDR-H2	EIDPSDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 22)
	CDR-H3	GYGNYGDY (SEQ ID NO: 23)
	CDR-L1	RSSKSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 24)
	CDR-L2	QMSNLAS (SEQ ID NO: 25)
	CDR-L3	AQNLELPWT (SEQ ID NO: 26)
IMGT:	CDR-H1	GYIFTSYW (SEQ ID NO: 27)
	CDR-H2	IDPSDSYT (SEQ ID NO: 28)
	CDR-H3	VRGYGNYGDY (SEQ ID NO: 29)
[0229]	CDR-L1	KSLLSNGITY (SEQ ID NO: 30)
	CDR-L2	QMS (SEQ ID NO: 31)
	CDR-L3	AQNLELPWT (SEQ ID NO: 26)
Chothia:	CDR-H1	GYIFTSY (SEQ ID NO: 32)
	CDR-H2	PSDS (SEQ ID NO: 33)
	CDR-H3	YGNYG (SEQ ID NO: 34)
	CDR-L1	SKSLLSNGITY (SEQ ID NO: 35)
	CDR-L2	QMS (SEQ ID NO: 31)
	CDR-L3	NLELPW (SEQ ID NO: 36)

[0230] 在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体可例如包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:37、39、41、43、45、47、49、51、53、55或57的氨基酸序列,并且该轻链可变区包含SEQ ID NO:59、61、63或65的氨基酸序列。抗Nectin-4抗体可例如包含:具有氨基酸序列:SYWMH(SEQ ID NO:21)的HCDR1或其至少4个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可被不同氨基酸取代;具有氨基酸序列:EIDPSDSYTNYNQKFKG(SEQ ID NO:22)的HCDR2或其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可被不同氨基酸取代;具有氨基酸序列:GYGNYGDY(SEQ ID NO:23)的HCDR3或其至少4、5或6个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可被不同氨基酸取代;具有氨基酸序列:RSSKSLLSNGITYLY(SEQ ID NO:24)的LCDR1或其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可被不同氨基酸取代;具有氨基酸序列:QMSNLAS(SEQ ID NO:25)的LCDR2区或其至少4、5或6个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可被不同氨基酸取代;和/或具有氨基酸序列:AQNLELPWT(SEQ ID NO:26)的LCDR3区或其至少4、5、6、7或8个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可缺失或被不同氨基酸取代。CDR位置可以根据Kabat编号。

[0231] 有利地,本公开的抗体可在用于制备抗体-缀合物的方法中使用。在一个实施方案中,用于制备抗体-缀合物的方法包括将细胞毒性剂(Z)与本公开的抗Nectin-4抗体或抗体片段缀合。在一个实施方案中,细胞毒性剂(Z)可以被指定为通过接头(X)与抗体或片段缀合。X是连接抗体或片段(Ab)和细胞毒性剂(Z)的接头,例如,在缀合时,X是与Ab和Z中一者或两者共价连接后的接头的残基。

[0232] 在本文的实施方案中,用于制备抗体-药物缀合物的方法包括使本公开的抗Nectin-4抗体或抗体片段(Ab)与细胞毒性剂(Z)接触和/或反应的步骤。接触可在合适的条件下进行,使得形成或获得本公开的一个方面的抗体药物缀合物。Z可例如包含在包含细胞毒性剂(Z)和接头(X)或接头(X)的一部分的化合物中,使得该步骤包括使本公开的抗Nectin-4抗体或抗体片段与包含细胞毒性剂(Z)和接头(X)或接头(X)的一部分的化合物接

触。方法可任选地指定以下步骤：分离或回收形成的抗体药物缀合物，以及任选地进一步加工该组合物以用作药物，任选地调配所述抗体（例如，与药物赋形剂一起）以施用于人类受试者。

[0233] 任选地，制备ADC的方法包括将抗体或抗体片段与2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个细胞毒性剂分子缀合。任选地，所获得的组合物的特征在于，DAR介于2和4之间、介于4和6之间、介于6和8之间。在一个实施方案中，方法包括将抗体与4个细胞毒性剂分子缀合。在一个实施方案中，方法包括将抗体与8个细胞毒性剂分子缀合。任选地，所述方法进一步包括评估DAR，并且如果DAR对应于预定规格（例如，本文公开的DAR或DAR范围，DAR约为2、4、6或8等），则进一步加工所述组合物以用作药物，任选地调配所述抗体（例如，与药物赋形剂一起）以施用于人类受试者。

[0234] 在一些实施方案中，在使包含(X)和(Z)的化合物与(Ab)接触(和反应)之前制备和分离接头(X)-(Z)元件，从而形成抗体药物缀合物。

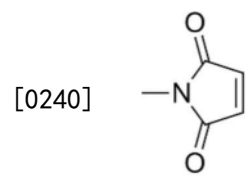
[0235] 在一些实施方案中，方法包括：

[0236] (a) 使接头(X)或接头(X)的一部分与(Ab)接触和/或反应以形成Ab-X缀合物，以及

[0237] (b) 使步骤(a)的Ab-X与细胞毒性剂(Z)或包含接头(X)和(Z)的第二部分的化合物接触和/或反应，从而形成抗体药物缀合物。

[0238] X可以例如表示例如在生理条件下，任选地在细胞内条件下包含可切割的部分的分子。在一个实施方案中，X表示包括(i)间隔子(Y)、(ii)可切割部分和(iii)任选的自消除或非自消除间隔子系统(Y')的分子。所述可切割部分可以例如是寡肽（例如二肽、三肽、四肽或五肽）。所述间隔子Y可以定位在Ab和所述可切割部分之间，并且所述间隔子系统(Y')可以定位在所述可切割部分和Z之间。

[0239] 在一些实施方案中，接头X或间隔子Y可以任选地被指定为包括反应性基团(R)，所述反应性基团能够与抗体的氨基酸或与附接至所述抗体的氨基酸的互补反应性基团(R')反应（例如在合适的条件下，任选地在脱保护之后）。任选地，R是与抗体上的游离氨基、羟基、巯基或羧基具反应性的基团。例如，R可以是具有以下结构的马来酰亚胺-N-基，该基团与抗体上的硫醇基（也称为巯基）反应：



[0241] 在一些实施方案中，接头X或间隔子Y可以任选地被指定为包括反应性基团R与抗体的氨基酸或与附接至所述抗体的氨基酸的互补反应性基团(R')反应的残基。任选地，R是与抗体上的游离氨基、羟基、巯基或羧基具反应性的基团与所述游离氨基、羟基、巯基或羧基反应的残基。

[0242] 在任何实施方案中，在使抗Nectin-4抗体或抗体片段与化合物（例如接头和/或细胞毒性剂）接触和/或反应的步骤之前，方法包括制备、选择或提供抗Nectin-4抗体或抗体片段的步骤。在一个实施方案中，该步骤包括制备、选择或提供抗Nectin-4抗体或抗体片段，以及确定或测试该抗体或抗体片段是否具有本公开的抗Nectin-4抗体或抗体片段的特征。

[0243] 例如,可测试抗Nectin-4抗体或抗体片段与Nectin-4的VC1桥接结构域结合的能力。然后使确定与Nectin-4的VC1桥接结构域结合的抗体或抗体片段与化合物(例如,接头(X)和/或细胞毒性剂(Z))接触和/或反应。例如,可测试抗Nectin-4抗体或抗体片段与突变体Nectin-4多肽(例如,包含残基K197和/或S199处的取代的突变体Nectin-4多肽)结合的能力。然后使确定与突变体Nectin-4多肽的结合减少或丧失(例如,相比于与野生型Nectin-4多肽的结合)的抗体或抗体片段与化合物(例如接头(X)和/或细胞毒性剂(Z))接触和/或反应。

[0244] 在另一个示例中,可测试抗Nectin-4抗体或抗体片段降低Nectin-4表达性肿瘤细胞(例如,粘附性肿瘤细胞)之间的细胞间粘附的能力和/或降低Nectin-4表达性肿瘤细胞的生长的能力(例如,在三维细胞培养物中,在肿瘤球状体形成测定中)。然后使确定具有降低Nectin-4表达性肿瘤细胞之间的细胞间粘附的能力和/或减少Nectin-4表达性肿瘤细胞(例如,粘附性肿瘤细胞)的生长的能力的抗体或抗体片段与化合物(例如,接头(X)和/或细胞毒性剂(Z))接触和/或反应。

[0245] 在另一个示例中,可测试抗Nectin-4抗体或抗体片段使肿瘤对细胞毒性剂(例如,细胞毒性剂Z或与Z相同类别的药物,例如喜树碱剂)敏化的能力。然后使确定具有使肿瘤对细胞毒性剂敏化的能力的抗体或抗体片段与化合物(例如,接头(X)和/或细胞毒性剂(Z))接触和/或反应。

[0246] 任选地,方法可包括在使抗体与化合物(例如,接头(X)和/或细胞毒性剂(Z))接触之前的任何两个或更多个抗体测试步骤。

[0247] 如本文进一步描述的,用于将细胞毒性药剂与抗体缀合的一些众所周知的方法涉及多个反应步骤,其中首先用接头或接头的一部分修饰抗体,然后进行使细胞毒性药剂与抗体-接头组合物缀合的反应。

[0248] 在一个实施方案中,提供了一种用于制备抗体-缀合物的方法,该方法包括:

[0249] (i) 通过培养用表达载体转化的宿主细胞来获得抗Nectin-4抗体,该表达载体含有编码抗体的多核苷酸;从获自先前步骤中的培养物中收集并纯化感兴趣的抗体;

[0250] (ii) 使抗Nectin-4抗体或抗体片段与化合物(L)接触,该化合物(L)包含(a)能够与抗体的氨基酸(例如,氨基酸的侧链或聚糖,或附接至氨基酸或氨基酸的聚糖的基团)反应的第一反应性基团和(b)第二反应性基团(R'),以获得包含用化合物(L)官能化的一个或多个氨基酸的经修饰的抗体;以及

[0251] (iii) 使步骤(i)的经修饰的抗体与包括以下各项的化合物反应:(a)与反应性基团(R')互补的反应性基团(R);(b)被细胞内肽酶或蛋白酶切割的氨基酸单元(例如二肽、三肽、四肽或五肽);(c)任选的非自消除或自消除间隔子(Y');以及(d)细胞毒性剂(Z)。任选地,步骤(ii)的化合物进一步包括置于R和氨基酸单元之间的间隔子(Y)。

[0252] 任选地,获得抗Nectin-4抗体的步骤可进一步包括以下步骤:通过注射抗原使动物免疫来制备抗体产生细胞,收集血液,测定其抗体滴度以确定何时切除脾;制备骨髓瘤细胞;将抗体产生细胞与骨髓瘤融合;筛选产生期望抗体的杂交瘤组;将杂交瘤分成单细胞克隆(克隆);培养杂交瘤或饲养植入杂交瘤的动物,以产生大量单克隆抗体;和/或检查由此产生的单克隆抗体的生物活性和结合特异性,或测定其作为标记试剂的性质;等。

[0253] 任选地,获得抗Nectin-4抗体的步骤可进一步包括制备细胞文库的步骤。

[0254] 在一个实施方案中,R和R'能够进行点击反应或环加成,任选地其中R包含或为炔烃部分并且R'包含或为叠氮化物部分,或者其中R'包含或为炔烃部分并且R包含或为叠氮化物部分,并且其中步骤(ii)的反应是1,3-偶极环加成。

[0255] 在一个实施方案中,步骤(i)的反应在存在催化剂的情况下进行,任选地所述催化剂是酶(例如,转谷氨酰胺酶)。

[0256] 在一个实施方案中,在使抗Nectin-4抗体或抗体片段与化合物(L)接触之前,步骤(i)包括修饰抗Nectin-4抗体或抗体片段的步骤。例如,可以通过使抗体或抗体片段与能够修饰抗体糖基化的酶反应或接触来修饰所述抗体或抗体片段(例如,在Kabat残基N297处)。在一个示例中,修饰包括在存在内切糖苷酶的情况下对具有核心N-乙酰氨基葡萄糖的抗体聚糖进行去糖基化,以获得包括核心N-乙酰氨基葡萄糖取代基的抗体,其中所述核心N-乙酰氨基葡萄糖和所述核心N-乙酰氨基葡萄糖取代基任选地被岩藻糖基化。内切糖苷酶的示例包括EndoS、EndoA、EndoE、Endo18A、EndoF、EndoM、EndoD、EndoH、EndoT和EndoSH和/或它们的组合。

[0257] 抗原结合蛋白(例如抗体)分子和细胞毒性剂(例如,喜树碱衍生物分子)通过接头连接。在此类实施方案中,免疫缀合物可以例如由式(II)表示:

[0258] $Ab-(X-(Z)_n)_m$ 式(II)

[0259] 其中,

[0260] Ab是抗Nectin 4抗体或抗体片段);

[0261] X是连接Ab和Z的接头,例如,与Ab和Z中一者或两者共价连接后的接头的残基;

[0262] Z是细胞毒性剂,例如喜树碱类似物,任选地Z包含化合物1或2的结构(依喜替康或SN-38分子);

[0263] n为1或2;以及

[0264] 当n为1时,m为1至8,或任选地m为选自1至8或1至6的整数,任选地m为选自1至4的整数,任选地m为2或4;任选地,m为2、3、4、5、6、7或8;并且当n为2时,m为1至4,或任选地m为选自1至4或1至3的整数,任选地m为选自1至4的整数,任选地m为2或4;任选地,m为1、2、4或4。任选地,“n”可以被指定为表示支化度或聚合度。“n”和“m”可以被指定为表示包括多种抗体的组合物中的平均值。

[0265] 在一个实施方案中,X表示例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下包含可切割的部分的分子。在一个实施方案中,X表示包括(i)间隔子(Y)、(ii)可切割部分和(iii)任选的自消除或非自消除间隔子系统(Y')的分子。所述间隔子Y可以定位在Ab和所述可切割部分之间,并且所述间隔子系统(Y')可以定位在所述可切割部分和Z之间。分子X或间隔子Y可以任选地被指定为包括反应性基团(R)或反应性基团R与抗体的氨基酸或与衔接至抗体的氨基酸的互补反应性基团(R')反应的残基。

[0266] 变量m表示免疫缀合物中每个抗体分子的 $-X-(Z)_n$ 部分的数量。在包括多个抗Nectin-4ADC的组合物中,每个抗体分子的 $-X-Z$ 部分的数量“m”可以变化。因此,在包括多个本文化学式的免疫缀合物的示例性组合物中,m是每个Ab的 $-X-(Z)_n$ 部分的平均数量,在这种情况下,m也可以被称为平均载药量或药物:抗体比率(DAR)。平均载药量或DAR可以有利地在每个Ab1个到约8个 $(-X-(Z)_n)$ 部分的范围内。与部分X衔接的Z部分的数量“n”可以例如为1或2。通常,n为1。在一些实施方案中,n为1,并且m表示平均载药量,m介于2和8之间。在一

些实施方案中, n为1, 并且m表示平均载药量, m介于2和6之间。在一些实施方案中, n为1, 并且m表示平均载药量, m介于4和8之间。在一些实施方案中, n为1, 并且m表示平均载药量, m介于6和8之间, 任选地为约6、7或8。在一些实施方案中, n为1, 并且m表示平均载药量, m介于4和6之间, 任选地为约4、5或6。

[0267] 每个Ab的(-X-Z)部分的数量可以通过常规方法表征, 如质谱法、ELISA测定法和HPLC。还可以确定免疫缀合物关于m的定量分布。在一些情况下, 可以通过如反相HPLC或电泳等手段来实现其中m为特定值的均质免疫缀合物的分离、纯化和表征, 以区别于具有其它载药量的免疫缀合物。

[0268] 在一个实施方案中, 用于本公开的治疗方法的抗Nectin-4组合物的特征在于包含多个由式(I)表示的免疫缀合物:

[0269] $Ab-(X-(Z)_n)_m$ 式(II)

[0270] 其中,

[0271] Ab是抗Nectin-4抗原结合蛋白(例如抗体或抗体片段);

[0272] X是连接Ab和Z的分子, 例如, 与Ab和Z中一者或两者共价连接后的接头的残基;

[0273] Z是细胞毒性剂, 任选地拓扑异构酶抑制剂, 任选地喜树碱类似物, 任选地包含依喜替康或SN-38分子(例如, 具有化合物1或2的结构的分子)的喜树碱类似物;

[0274] n为1或2; 以及

[0275] 其中抗体样品中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%的免疫缀合物的m(X-Z部分的数量)为2或4、至少2、介于2和4之间、至少4、介于4和6之间或介于4和8之间, 任选地其中n为1, 并且抗体样品中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%的免疫缀合物的m(X-Z部分的数量)为2或4、至少2、介于2和4之间、至少4、介于4和6之间或介于4和8之间。

[0276] 在一个实施方案中, 用于本公开的治疗方法的抗Nectin-4组合物的特征在于包含多个由式(I)表示的免疫缀合物:

[0277] $Ab-(X-(Z)_n)_m$ 式(II)

[0278] 其中,

[0279] Ab是抗Nectin-4抗原结合蛋白(例如抗体或抗体片段);

[0280] X是连接Ab和Z的分子, 例如, 与Ab和Z中一者或两者共价连接后的接头的残基;

[0281] Z是喜树碱类似物, 其包括依喜替康或SN-38分子的分子, 例如包括化合物1或2的结构的分子;

[0282] n为1; 以及

[0283] 其中抗体样品中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%的免疫缀合物的m(X-Z部分的数量)为6、至少6、介于6和8之间或8。

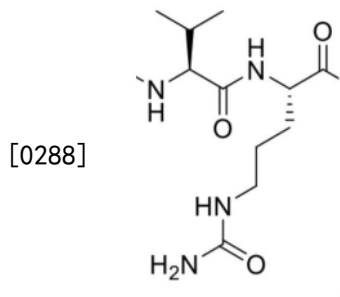
[0284] 应当理解, 多种方法可用于将包含细胞毒性剂的接头与抗体或抗原结合蛋白共价连接, 非特异性或特异性连接至特定氨基酸残基。接头(X)可例如在生理条件下, 任选地如实施例中所示在细胞内条件下包含可切割的部分, 使得接头的切割在细胞内环境中释放细胞毒性剂(例如, 化合物1、化合物2、化合物13等)。接头可以与抗体分子上的化学反应性基团结合, 例如与游离氨基、亚氨基、羟基、硫醇或羧基结合(例如, 结合至N末端或C末端、结合至一个或多个赖氨酸残基的ε氨基、一个或多个谷氨酸或天冬氨酸残基的游离羧基团、或

结合至一个或多个半胱氨酰残基的巯基),与碳水化合物结合,或通常与引入或工程化到抗体中的任何反应性基团结合。与接头结合的位点可以是抗体分子氨基酸序列中的天然残基,或者可以将其引入抗体分子中,例如通过DNA重组技术(例如,通过在氨基酸序列中引入半胱氨酸或蛋白酶切割位点,通过引入非天然氨基酸残基)或通过蛋白质生物化学(例如,还原、pH调节或蛋白水解,通过糖工程、氨基酸结合聚糖的酶促修饰)。

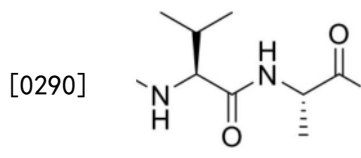
[0285] 在一些实施方案中,接头(X)包含肽残基,这些肽残基包含选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、丙氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸的氨基酸,任选地接头(X)包含二肽、三肽或四肽残基。

[0286] 在某些实施方案中,作为接头(X)的前体的中间体在适当条件下与细胞毒性药剂(Z)反应。在某些实施方案中,在细胞毒性药剂和/或中间体上使用反应性基团。在一些实施方案中,细胞毒性药剂与中间体或衍生的细胞毒性药剂之间的反应产物随后在适当条件下与抗体分子反应。在其它实施方案中,接头(X)的前体首先在适当的条件下与抗体分子反应以产生与接头(X)的前体结合的抗体,所述抗体随后与包括细胞毒性药剂(Z)的分子反应。

[0287] 在一些实施方案中,接头(X)能够被存在于细胞内环境中(例如,在溶酶体或内体或小窝内)的切割剂切割。接头可以包括例如被细胞内肽酶或蛋白酶(包括但不限于溶酶体或内体蛋白酶)切割的肽基接头或氨基酸单元。在一些实施方案中,肽基接头部分是至少两个氨基酸长或至少三个氨基酸长。切割剂可以包含组织蛋白酶B和D以及纤溶酶,已知所有这些都会水解二肽药物衍生物,从而在靶细胞内释放活性药物。最典型的是能够被细胞中存在的酶切割的肽基接头。在一个具体的实施方案中,能够被细胞内蛋白酶切割的肽基接头是Val-Cit接头或Phe-Lys接头(参见例如,美国专利第6,214,345号,其描述了多柔比星与缬氨酸-瓜氨酸接头的合成)。缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)元件可以具有如下所示的结构:



[0289] 在另一个具体实施方案中,能够被细胞内蛋白酶切割的肽基接头是缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)接头。val-ala元件可以具有如下所示的结构:



[0291] 在另一个具体的实施方案中,能够被细胞内蛋白酶切割的肽基接头是含有甘氨酸的寡肽接头,例如含有甘氨酸和苯丙氨酸的寡肽接头,任选地GGF、DGGF、(D-)D-GGF、EGGF、SGGF、KGGF、DGGFG (SEQ ID NO:71)、DDGGFG (SEQ ID NO:72)、KDGGFG (SEQ ID NO:73)、GGFGGGF (SEQ ID NO:74)、GGFG、GGFGG (SEQ ID NO:75)或GGFGGG (SEQ ID NO:76)接头(参见例如美国专利第6,835,807号,其公开内容以引用方式并入本文),其中“(D-)D”表示D-天冬氨酸。

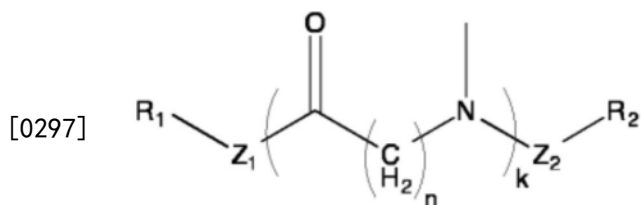
[0292] 在一些实施方案中,接头还可用作间隔子或延伸物以使抗体与Z保持距离,以便避免干扰抗体结合Nectin-4和/或抑制由Nectin-4介导的细胞间相互作用的能力。接头可以包括间隔子单元(Y)和/或间隔子或间隔子系统(Y')。因此,间隔子Y可以定位在Ab和可切割部分之间。间隔子系统(Y')可定位在可切割部分和Z之间。分子X或间隔子Y可任选地被指定为包含反应性基团(R)或反应性基团R与抗体的氨基酸或与衔接至抗体的氨基酸的互补反应性基团(R')反应的残基。间隔子Y可例如是与抗体的氨基酸(例如,抗体的硫原子、伯氨基或仲氨基或碳水化合物基团)形成键(例如,通过其反应性基团R)的分子,并且间隔子或延伸物(Y)将抗体连接至细胞毒性剂(Z)或可切割的氨基酸单元(例如,肽基接头、可切割的二肽、三肽、四肽或五肽),可切割的氨基酸单元任选地进一步具有自消除和/或非自消除间隔子(Y'),其进而连接至Z。因此,当间隔子(Y)的一端与氨基酸单元(例如,可切割的二肽、三肽、四肽或五肽)连接时,可切割的氨基酸单元可以进而直接连接至Z或者可包含另一种间隔子(Y'),诸如连接氨基酸单元和Z的非自消除或自消除间隔子。

[0293] 间隔子(Y)可以任选地被指定为或包括经取代或未经取代的烷基或杂烷基链,任选地其中Y的链长为2-100个原子,任选地2-40个、2-30个、2-20个、4-40个、4-30个或4-20个原子,任选地其中一个或多个原子可以不是碳,例如是氧、硫、氮或其它原子,任选地其中链的任何碳被烷氧基、羟基、烷基羰氧基、烷基-S-、硫醇、烷基-C(O)S-、胺、烷基胺、酰胺或烷基酰胺取代。

[0294] 间隔子(Y)可以任选地被指定为包括稳定性增强部分。例如,间隔子Y可以在接头设计中正交聚乙二醇(PEG)部分或聚肌氨酸(聚-N-甲基甘氨酸或PSAR)部分(参见例如,W02019/081455、W02015/057699和W02016/059377,其公开内容通过引用并入本文)。

[0295] 在一些具体实施方案中,间隔子(Y)可包括一个或多个环氧乙烷单体,任选地Y包括聚环氧乙烷部分,任选地Y包括介于1个和24个之间、任选地1个和12个之间、任选地1个和8个之间、任选地6个和24个之间的聚环氧乙烷部分,任选地Y包括结构 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x$,其中x为1至24,任选地1至12,任选地1至6,任选地6至24。

[0296] 合适的稳定性增强部分的示例,间隔子链Y,可包括在PCT公开号W02015/057699或W02019/081455中公开的稳定性增强部分。例如,间隔子链Y可以包括正交连接子部分和稳定性增强部分。稳定性增强部分可以是PEG均聚物,或通常是结合到正交连接子部分的任何单一分子量均聚物(例如PEG或聚肌氨酸均聚物)。均聚物可具有例如1-4个、1-6个、1-7个、1-8个、1-10个、1-12个、至少6个、8个或10个,或6-12个、6-24个、6-72个、或不超过6个、7个或8个PEG单元或其它单体。术语正交连接子是指将接头部分(例如,间隔子Y的链)连接至均聚物单元并通过接头(例如,可切割的寡肽(Pep)和间隔子Y')连接到细胞毒性剂(Z)以使均聚物单元相对于细胞毒性剂处于平行构型(与串联构型相反)(均聚物与Pep-Y'-Z部分平行)的支链接头单元组件。正交连接子部分可以例如是一种或多种天然或非天然氨基酸,其任选地选自谷氨酸、赖氨酸和甘氨酸。任选地,氨基酸正交连接子部分置于间隔子链Y的末端,使得正交连接子部分氨基酸残基通过一个氨基酸的 α -羧基与另一个氨基酸的 α -氨基之间的肽键连接到肽基接头的氨基酸残基(例如,式V或VI中的(Pep))。Y可以例如包括正交连接子部分与式D的部分反应的结果:



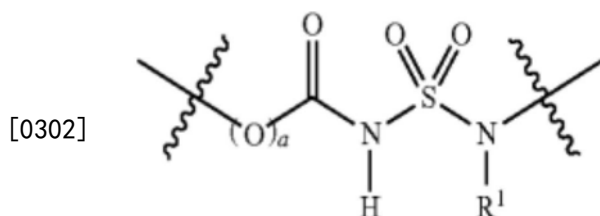
式 D

[0298] 其中 R_1 和 R_2 不同,并且

[0299] R_1 和 R_2 中的一者是H或惰性基团, R_1 和 R_2 中的另一者是功能化反应性基团,所述基团对于与正交连接子部分的可结合基团共价结合是反应性的,在惰性基团是非反应性的此类反应条件下, Z_1 和 Z_2 ,相同或不同,是任选的间隔子,并且 n 为1或更大并且 k 为2或更大。

[0300] 任选地,正交连接子衍生自谷氨酸。

[0301] 在另一个示例中,间隔子Y包括美国专利出版物第US2017/0072068A1号(其公开内容通过引用并入本文)中公开的基团,例如根据式(E)或其盐的基团:



式 E

[0303] 其中

[0304] a 为0或1;并且

[0305] R^1 选自由以下组成的组:氢、 C_1 - C_{24} 烷基、 C_3 - C_{24} 环烷基、 C_2 - C_{24} (杂)芳基、 C_3 - C_{24} 烷基(杂)芳基和 C_3 - C_{24} (杂)芳基烷基,这些 C_1 - C_{24} 烷基、 C_3 - C_{24} 环烷基、 C_2 - C_{24} (杂)芳基、 C_3 - C_{24} 烷基(杂)芳基和 C_3 - C_{24} (杂)芳基烷基任选地被选自O、S和 NR^3 的一个或多个杂原子取代并任选地被所述一个或多个杂原子中断,其中 R^3 独立地选自由氢和 C_1 - C_4 烷基组成的组;并且其中根据式E或其盐的基团位于间隔子链Y的所述第一端和第二端之间。

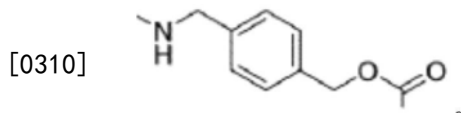
[0306] 根据此方面,间隔子Y可包含-(琥珀酰亚胺-3-基-N)- CH_2CH_2 -C(=O)-、-(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $CH_2CH_2CH_2$ -C(=O)-、-(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2$ -C(=O)-、-(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$ -C(=O)-。

[0307] 任选地,此类间隔子Y可进一步包含以下结构: $-NH-(CH_2CH_2-O)_n-CH_2CH_2-C(=O)-$,其中 n 为1至6、优选地2至4的整数。此类结构包括例如 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-$ 。

[0308] 放置在氨基酸单元(例如可切割的二肽、三肽、四肽或五肽)和Z之间的间隔子或间隔子系统(Y')可以是自消除或非自消除的。例如,间隔子 Y' 可以包括经取代或未经取代的烷基或杂烷基链,任选地其中Y的链长为2-30个原子,任选地2-20个、4-20个、2-10个或4-20个原子,任选地其中一个或多个原子可以不是碳,例如是氧、硫、氮或其它原子,任选地其中链的任何碳被烷氧基、羟基、烷基羰氧基、烷基-S-、硫醇、烷基-C(O)S-、胺、烷基胺、酰胺或

烷基酰胺取代。在一个实施方案中, Y' 包括对氨基苄氧羰基。在一个实施方案中, Y' 是非自消除间隔子并且包含 $-(CH_2)_n-C(=O)-$ 的结构, 其中 n 为 0 至 5 的整数, 所述结构通过 $-O-$ 或单键连接至可切割部分。例如, Y' 可以是或可包括 $-C(=O)-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-O-CH_2-C(=O)-$ 、 $-O-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-O-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-O-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-O-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-HO-O-CH_2-C(=O)-$ 、 $-CH_2-C(=O)-$ 、 $-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 或 $-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 基团。

[0309] “自消除”间隔子单元允许药物部分的释放, 而无需单独的水解步骤。当使用自消除间隔子时, 在氨基酸单元的切割或转化后, 间隔子的与氨基酸单元连接的一侧变为未封闭, 这导致最终释放一个或多个部分 Z。自消除间隔子系统可以例如是在 W002/083180 和 W02004/043493 (其公开内容通过引用整体并入本文) 中描述的那些自消除间隔子系统, 以及本领域技术人员已知的其它自消除间隔子。在某些实施方案中, 接头的间隔子单元包括对氨基苄基单元。在一个此类实施方案中, 对氨基苯甲醇通过酰胺键附接到氨基酸单元, 并且在苯甲醇和细胞毒性药剂之间制备氨基甲酸酯、氨基甲酸甲酯或碳酸酯。在一个实施方案中, 间隔子单元是例如具有以下结构的对氨基苄氧羰基 (PAB):

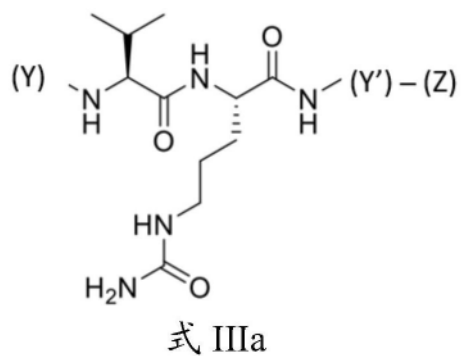


[0311] 自消除间隔子单元的示例进一步包含但不限于在电子上与对氨基苯甲醇相似的芳族化合物 (参见例如, US 2005/0256030 A1), 诸如 2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物 (Hay 等人 (1999) 《生物有机化学与医药化学快报 (Bioorg. Med. Chem. Lett.)》9:2237) 和邻氨基苄基缩醛或对氨基苄基缩醛。可以使用间隔子在酰胺键水解时进行环化, 如经取代和未经取代的 4-氨基丁酸酰胺 (Rodrigues 等人, 《化学生物学 (Chemistry Biology)》, 1995, 2, 223) 和 2-氨基苯基丙酸酰胺 (Amsberry 等人, 《有机化学杂志 (J. Org. Chem.)》, 1990, 55, 5867)。消除在甘氨酸的 α 位被取代的含胺药物 (Kingsbury 等人, 《药物化学杂志 (J. Med. Chem.)》, 1984, 27, 1447) 也是自消除间隔子的示例。对氨基苄基自消除间隔子 (例如, PAB) 特别适合与 Phe-Lys、Val-Ala 或 Val-Cit 可切割的二肽单元一起使用 (PAB 置于二肽和喜树碱衍生物 (Z) 之间)。

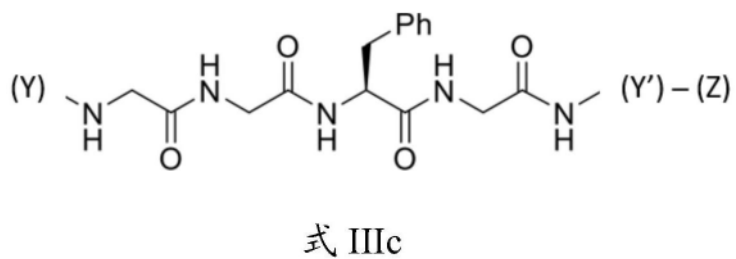
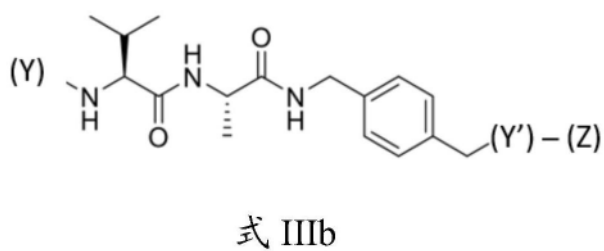
[0312] “非自消除”间隔子单元是这样一种间隔子单元, 其中部分或全部间隔子单元在抗体-感兴趣的部分缀合物的酶促 (例如, 蛋白水解) 切割时保持与部分 Z 结合。适合用作 Gly-Gly-Phe-Gly 氨基酸单元和依喜替康分子之间的间隔子的非自消除间隔子单元的示例包括但不限于包括 $-O-CH_2-C(=O)-$ 、 $-HO-O-CH_2-C(=O)-$ 、 $-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 和 $-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ (例如, 以形成 GGFG- $CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 依喜替康单元)。在 GGFG 氨基酸单元和依喜替康之间使用此种间隔子导致具有化合物 13 的结构的分子的释放。非自消除间隔子单元的其它示例包含但不限于甘氨酸间隔子单元和甘氨酸-甘氨酸间隔子单元。可以以类似方式使用对序列特异性酶促切割敏感的肽间隔子的其它已知组合。例如, 肿瘤细胞相关蛋白酶对含有甘氨酸-甘氨酸间隔子单元的抗体-所关注部分缀合物的酶促切割将导致甘氨酸-甘氨酸-药物部分从抗体-所关注部分缀合物的剩余部分释放。在一个此类实施方案中, 甘氨酸-甘氨酸-药物部分随后在肿瘤细胞中经历

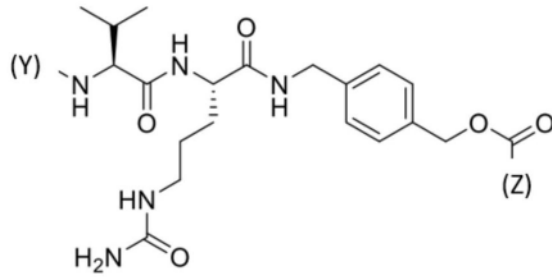
单独的水解步骤,从而将甘氨酸-甘氨酸间隔子单元从药物部分上切割下来。

[0313] 示例性的接头-细胞毒性药物部分 (X-Z) 可包含下式III和IV中所示的任何结构。



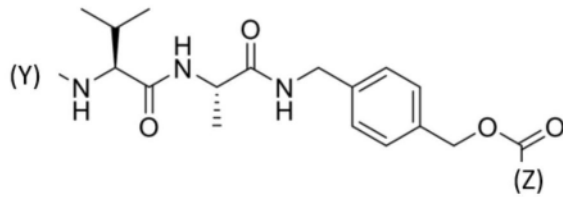
[0314]



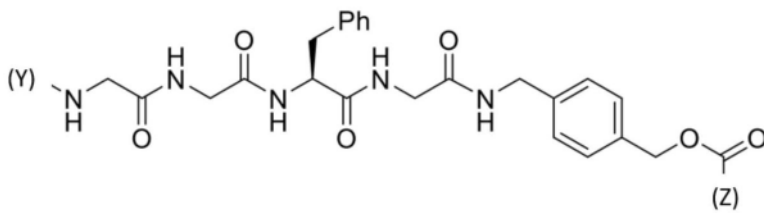


式 IVa

[0315]



式 IVb



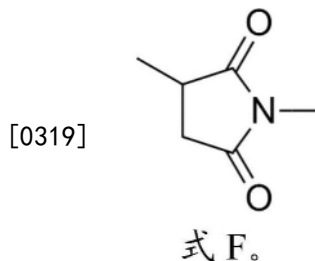
式 IVc。

[0316] 间隔子(Y)和(Y')可以任选地被指定为独立地选自由以下组成的组:直链或支链C₁-C₂₀亚烷基、C₂-C₂₀亚烯基、C₂-C₂₀亚炔基、C₃-C₂₀亚环烷基、C₅-C₂₀亚环烯基、C₈-C₂₀亚环炔基、C₇-C₂₀烷基亚芳基、C₇-C₂₀芳基亚烷基、C₈-C₂₀芳基亚烯基和C₉-C₂₀芳基亚炔基,这些亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基任选地被选自由O、S和NR¹组成的组的一个或多个杂原子取代并任选地被该一个或多个杂原子中断,其中R¹独立地选自由以下组成的组:氢、C₁-C₂₄烷基、C₂-C₂₄烯基、C₂-C₂₄炔基和C₃-C₂₄环烷基,这些烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。

[0317] 间隔子(Y)和(Y')可任选地被指定为是或包含C₁-C₁₀亚烷基-、-C₁-C₁₀杂亚烷基-、-C₃-C₈碳环基-、-O-(C₁-C₈烷基)-、-亚芳基-、-C₁-C₁₀亚烷基-亚芳基-、-亚芳基-C₁-C₁₀亚烷基-、-C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈碳环基)-、-(C₃-C₈碳环基)-C₁-C₁₀亚烷基-、-C₃-C₈杂环基-、-C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈杂环基)-、-(C₃-C₈杂环基)-C₁-C₁₀亚烷基-、-C₁-C₁₀亚烷基-C(=O)-、-C₁-C₁₀杂亚烷基-C(=O)-、-C₃-C₈碳环基-C(=O)-、-O-(C₁-C₈烷基)-C(=O)-、-亚芳基-C(=O)-、-C₁-C₁₀亚烷基-亚芳基-C(=O)-、-亚芳基-C₁-C₁₀亚烷基-C(=O)-、-C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈碳环基)-C(=O)-、-(C₃-C₈碳环基)-C₁-C₁₀亚烷基-C(=O)-、-C₃-C₈杂环基-C(=O)-、-C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈杂环基)-C(=O)-、-(C₃-C₈杂环基)-C₁-C₁₀亚烷基-C(=O)-、-C₁-C₁₀亚烷基-NH-、-C₁-C₁₀杂亚烷基-NH-、-C₃-C₈碳环基-NH-、-O-(C₁-C₈烷基)-NH-、-亚芳基-NH-、-C₁-C₁₀亚烷基-亚芳基-NH-、-亚芳基-C₁-C₁₀亚烷基-NH-、-C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈碳环基)-NH-、-

(C₃-C₈碳环基)-C₁-C₁₀亚烷基-NH-、-C₃-C₈杂环基-NH-、-C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈杂环基)-NH-、-(C₃-C₈杂环基)-C₁-C₁₀亚烷基-NH-、-C₁-C₁₀亚烷基-S-、-C₁-C₁₀杂亚烷基-S-、-C₃-C₈碳环基-S-、-O-(C₁-C₈烷基)-S-、-亚芳基-S-、-C₁-C₁₀亚烷基-亚芳基-S-、-亚芳基-C₁-C₁₀亚烷基-S-、-C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈碳环基)-S-、-(C₃-C₈碳环基)-C₁-C₁₀亚烷基-S-、-C₃-C₈杂环基-S-、-C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈杂环基)-S-、-(C₃-C₈杂环基)-C₁-C₁₀亚烷基-S-、-C₁-C₁₀亚烷基-O-C(=O)-、-C₃-C₈碳环基-O-C(=O)-、-O-(C₁-C₈烷基)-O-C(=O)-、-亚芳基-O-C(=O)-、-C₁-C₁₀亚烷基-亚芳基-O-C(=O)-、-亚芳基-C₁-C₁₀亚烷基-O-C(=O)-、-C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈碳环基)-O-C(=O)-、-(C₃-C₈碳环基)-C₁-C₁₀亚烷基-O-C(=O)-、-C₃-C₈杂环基-O-C(=O)-、-C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈杂环基)-O-C(=O)-、-(C₃-C₈杂环基)-C₁-C₁₀亚烷基-O-C(=O)-, 这些基团在每种情况下被选自以下的取代基中的一种或多种取代基取代: -X、-R'、-O、-OR'、=O、-SR'、-S-、-NR'₂、-NR'₃⁺、=NR'、-CX₃、-CN、-OCN、-SCN、-N=C=O、-NCS、-NO、-NO₂、=N₂、-N₃、-NR'C(=O)R'、-C(=O)R'、-C(=O)NR'₂、-SO₃⁻、-SO₃H、-S(=O)₂R'、-OS(=O)₂OR'、-S(=O)₂NR'、-S(=O)R'、-OP(=O)(OR')₂、-P(=O)(OR')₂、-PO₃、-PO₃H₂、-C(=O)X、-C(=S)R'、-CO₂R'、-CO₂、-C(=S)OR'、C(=O)SR'、C(=S)SR'、C(=O)NR'₂、C(=S)NR'₂和C(=NR')NR'₂, 其中每个X独立地为卤素: -F、-Cl、-Br或-I; 并且每个R'独立地为-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₆-C₂₀芳基或-C₃-C₁₄杂环。

[0318] 在一个实施方案中, 间隔子(Y)可任选地被指定为例如在链的一端包含与抗体上的游离氨基、羟基、巯基或羧基或碳水化合物反应的反应性基团(R)。在一些方面, 间隔子Y包含R基团-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-(CH₂)_n³-C(=O), 其中n³是2至8的整数, 并且-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-具有由以下式F表示的结构:



[0320] 以上结构的位置3可以是与抗体的连接位置。在位置3与抗体的键的特征在于通过形成硫醚进行键合。

[0321] 在一个实施方案中, 间隔子(Y)可任选地被指定为例如在链的一端包含: 反应性基团(R), 该反应性基团与附接至抗体的氨基酸(例如, 通过游离氨基、羟基、巯基或羧基或碳水化合物)的互补反应性基团(R')具有反应性; 或在与抗Nectin-4抗体缀合时, 反应性基团(R)与抗体上的游离氨基、羟基、巯基或羧基或与附接至抗体的氨基酸的互补反应性基团(R')反应的残基。反应性基团对R和R'的示例包含一系列基团, 这些基团能够进行双正交反应, 优选地环加成, 例如Diels-Alder反应或1,3-偶极环加成, 例如在叠氮化物和环辛炔之间(无铜点击化学)、在硝酮和环辛炔之间, 由醛和酮形成肟/腙以及四嗪连接(另见W02013/092983或US2017/0072068A1, 其公开内容通过引用并入本文)。例如, R可以是炔烃并且R'可以是叠氮化物, 或者R可以是叠氮化物并且R'可以是炔烃。所得接头和官能化抗体或其Y元件因此在任何实施方案中可以包括由R和R'反应产生的基团(RR'), 例如RR'可以是或包括由炔烃和叠氮化物反应产生的三唑。

[0322] 在一个实施方案中,反应性基团R和R'是互补的试剂,它们一起能够进行“点击”反应(即,点击化学试剂或反应性基团)。例如,1,3-偶极官能化合物可以在环化反应中与炔烃反应形成杂环化合物,优选地在基本上不存在添加的催化剂(例如,Cu(I))的情况下。具有与其附接的至少一个1,3-偶极基团的多种化合物(具有含有在三个原子上离域的4个电子的三原子 π 电子系统)可用于与本文公开的炔烃反应。示例性的1,3-偶极基包含但不限于叠氮化物、腈氧化物、硝酮、偶氮氧基和酰基重氮基。

[0323] 示例包含邻膦芳酸酯、叠氮化物、雷酸盐、炔烃(包含任何应变环炔烃)、氰化物、蒽、1,2,4,5-四嗪或降冰片烯(或其它应变环烯烃)。

[0324] 在一个实施方案中,R是具有末端炔烃或叠氮化物的部分;此类部分描述于例如美国专利第7,763,736号中,其公开内容通过引用并入本文。使用铜(和其它金属盐)作为末端炔烃和叠氮化物之间的点击反应催化剂的合适反应条件在美国专利第7,763,736号中公开。

[0325] 在一个实施方案中,R是经取代或未经取代的环炔烃。包含特定化合物的环炔烃描述于例如美国专利第7,807,619号中,其公开内容通过引用并入本文。

[0326] 在一些实施方案中,环炔烃可以是式A化合物:



[0328] 其中:

[0329] R^1 选自羰基、烷基酯、芳基酯、经取代的芳基酯、醛、酰胺、芳基酰胺、烷基卤化物、硫酸酯、磺酰酯、烷基酮、芳基酮、经取代的芳基酮和卤代磺酰基;

[0330] R^1 可以在环辛炔基团上的任何位置,而不是在通过三键连接的两个碳上。

[0331] 在一些实施方案中,经修饰的环炔烃具有式A,其中环辛炔环中的一个或多个碳原子,除了通过三键连接的两个碳原子之外,被一个或多个吸电子基团取代,例如,卤素(溴、氯、氟、碘)、硝基、氰基、砷基或磺酸基。因此,例如,在一些实施方案中,主题经修饰的环炔烃具有式B:

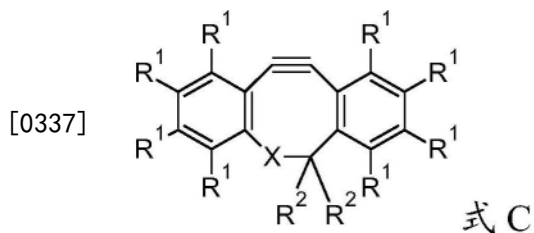


[0333] 其中:

[0334] R^2 和 R^3 各自独立地为:(a)H;(b)卤素原子(例如,溴、氯、氟、碘);(c) $-W-(CH_2)_n-Z$ (其中:n是1-4的整数(例如,n=1、2、3或4);W,如果存在,是O、N或S;并且Z是硝基、氰基、磺酸或卤素);(d) $-(CH_2)_n-W-(CH_2)_m-R^4$ (其中:n和m各自独立地为1或2;W是O、N、S或磺酰基;如果W是O、N或S,则 R^4 是硝基、氰基或卤素;并且如果W是磺酰基,则 R^4 是H);或(e) $-(CH_2)_n-R^4$ (其中:n是1-4的整数(例如,n=1、2、3或4);并且 R^4 是硝基、氰基、磺酸或卤素);以及

[0335] R^1 选自羰基、烷基酯、芳基酯、经取代的芳基酯、醛、酰胺、芳基酰胺、烷基卤化物、硫酸酯、磺酰酯、烷基酮、芳基酮、经取代的芳基酮和卤代磺酰基。 R^1 可以在环辛炔基团上的任何位置,而不是在通过三键连接的两个碳上。

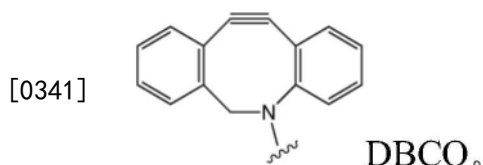
[0336] 在一个实施方案中,R是经取代或未经取代的杂环应变炔烃。包括特定化合物的环炔烃描述于例如美国专利第8,133,515号中,其公开内容通过引用并入本文。在一个实施方案中,炔烃具有式C:



[0338] 其中:

[0339] 每个R¹独立地选自由以下组成的组:氢、卤素、羟基、烷氧基、硝酸盐、亚硝酸盐、硫酸盐和C₁-C₁₀烷基或杂烷基;

[0340] 每个R²独立地选自由以下组成的组:氢、卤素、羟基、烷氧基、硝酸盐、亚硝酸盐、硫酸盐和C₁-C₁₀有机基团;X表示N-R³R⁴、NH-R⁴、CH-N-OR⁴、C-N-NR³R⁴、CHOR₄或CHNHR₄;并且每个R³表示氢或有机基团,并且R⁴表示接头的连接部分C。在一个实施方案中,R或R'是以下DBC0(二苄基环辛基)基团:



[0342] 如上文所述的那些炔烃可以在环化反应中与至少一种1,3-偶极官能化合物反应形成杂环化合物,优选地在基本上不存在添加的催化剂(例如,Cu(I))的情况下。具有与其附接的至少一个1,3-偶极基团的多种化合物(具有含有在三个原子上离域的4个电子的三原子π电子系统)可用于与本文公开的炔烃反应。示例性的1,3-偶极基包含但不限于叠氮化物、腈氧化物、硝酮、偶氮氧基和酰基重氮基。

[0343] 在本文的化学式中,Y'可以任选地不存在或可以是间隔子,任选地为自消除间隔子,例如包含对氨基苄基单元,或非自消除间隔子。任选地,Y'为或包括经取代或未经取代的烷基或杂烷基链,任选地其中Y的链长为2-40个原子,任选地2-30个、2-20个、4-40个、4-30个或4-20个原子,任选地其中一个或多个原子可以不是碳,例如是氧、硫、氮或其它原子,任选地其中链的任何碳被烷氧基、羟基、烷基羰氧基、烷基-S-、硫醇、烷基-C(O)S-、胺、烷基胺、酰胺或烷基酰胺取代。

[0344] 可以与抗Nectin-4抗体缀合的示例性接头-细胞毒性剂分子(例如,式I到XI的X-Z部分)可以任选地由式V表示:

[0345] (R) - (Y) - (Pep) - (Y') - (Z) 式(V)

[0346] 其中,

[0347] R是与抗体上的游离氨基、羟基、巯基或羧基具反应性或附接至抗体的氨基酸的互补反应性基团(R')具反应性的基团,或在与抗Nectin-4结合蛋白缀合时,R是反应性基团(R)与抗体上的游离氨基、羟基、巯基或羧基或与附接至抗体的氨基酸的互补反应性基团(R')反应的残基;

[0348] Y任选地不存在或者是间隔子;

[0349] Pep是或包括被细胞内肽酶或蛋白酶切割的肽基接头,例如缬氨酸-瓜氨酸、缬氨酸-丙氨酸或苯丙氨酸-赖氨酸二肽;

[0350] Y'任选地不存在或者是间隔子,任选地是自消除间隔子或非自消除间隔子;以及

[0351] Z是细胞毒性剂,任选地是喜树碱类似物,任选地是依喜替康分子、Dxd或SN-38分子。

[0352] 根据本发明的所得Nectin-4结合性免疫缀合物可以例如由式(VI)表示:

[0353] Ab-(Y)-(Pep)-(Y')-(Z)式(VI)

[0354] 其中,

[0355] Ab是抗Nectin-4抗体;

[0356] Y任选地不存在或者是间隔子。任选地,式VI在(Ab)和(Y)之间包含反应性基团(例如,马来酰亚胺、伯胺)与抗Nectin-4抗原结合蛋白(Ab)的氨基酸的侧链或碳水化合物反应的残基。任选地,反应性基团(例如马来酰亚胺、伯胺)与抗Nectin-4抗原结合蛋白(Ab)的氨基酸的侧链反应的残基可以被指定为包括在Y中;

[0357] Pep是或包括被细胞内肽酶或蛋白酶切割的氨基酸单元(例如肽基接头)(例如,(Pep)是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽,例如缬氨酸-瓜氨酸、缬氨酸-丙氨酸或苯丙氨酸-赖氨酸单元);

[0358] Y'任选地不存在或者是间隔子,任选地是自消除间隔子或非自消除间隔子;以及

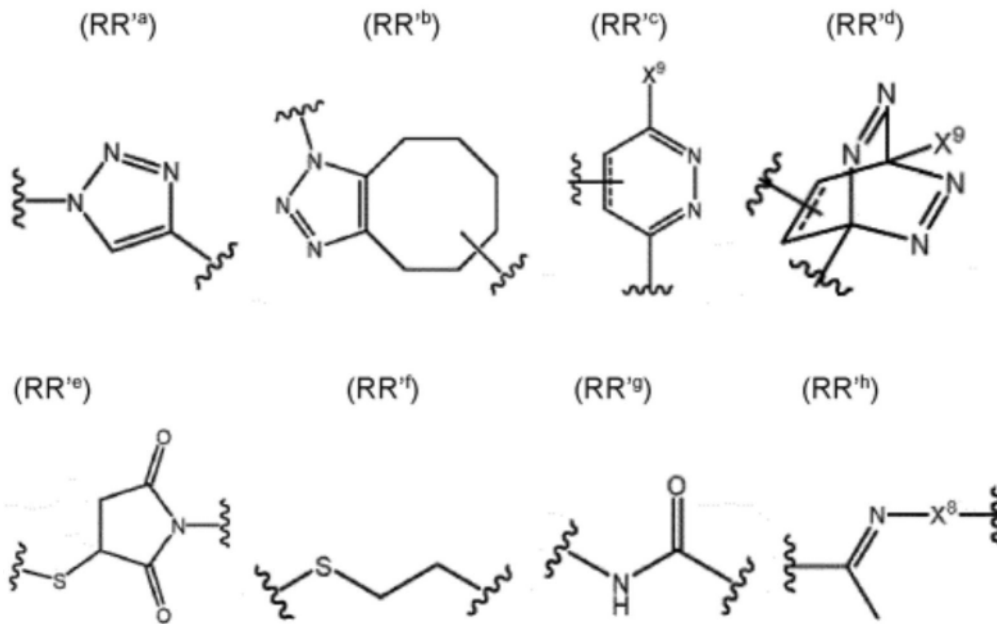
[0359] Z是细胞毒性剂,任选地是喜树碱衍生物,任选地是依喜替康分子、Dxd或SN-38分子。

[0360] 任选地,该式可以被指定为(例如,在(Ab)和Y(或(Pep)或X),如果Y不存在的话)的末端之间)包含反应性基团(R)与抗体上的游离氨基、羟基、巯基或羧基或与附接至抗体的氨基酸的互补反应性基团(R')反应的残基(RR')。

[0361] 在一个示例中,其中(RR')是反应性基团(R)与附接至抗体的互补反应性基团(R')反应的残基(例如R'附接至抗体的氨基酸的侧链或聚糖),根据本发明的Nectin-4结合性免疫缀合物可以例如由式(VI_{bis})表示:

[0362] Ab-(RR')-(Y)-(Pep)-(Y')-(Z)式(VI_{bis})

[0363] 其中,Ab、Y、Pep、Y'和Z如式VI中所定义,并且RR'是双正交反应(优选地环加成,例如Diels-Alder反应或1,3-偶极环加成)的结果。在一个实施方案中,RR'具有选自自由以下组成的组的结构:



[0364]

[0365] 其中 X^8 为O或NH, X^9 选自H、甲基和吡啶基,并且在结构(RR'^c)和(RR'^d)中,——键表示单键或双键。

[0366] 在任何实施方案中,依喜替康分子(或其它6环喜树碱)可以被指定为通过依喜替康的位置1处的胺与 Y' (或(Pep),如果 Y' 不存在的话)结合。

[0367] 在任何实施方案中,SN-38分子(或其它5环喜树碱)可以被指定为通过SN-38的位置9处的胺与 Y' (或(Pep),如果 Y' 不存在的话)结合。

[0368] 细胞毒性剂,也称为(Z)部分,包括例如细胞毒性剂,诸如抗肿瘤剂。细胞毒性剂的示例是本领域已知的。例如,Z可以是烷化剂,优选地DNA烷化剂。烷化剂是可以在生理条件下(例如,pH 7.4、37°C、水溶液)用烷基替换氢原子的化合物。烷化反应通常根据N、O和S杂原子亲核试剂与亲电子烷化剂的取代反应来描述,但迈克尔加成反应也是重要的。烷化剂的示例包括氮芥和硫芥、乙烯亚胺、甲磺酸盐、CC-1065和倍癌霉素、亚硝基脲、含铂剂、实现拓扑异构酶II介导的DNA位点依赖性烷化的剂(例如普梭草素(psorospermin)和相关双咪喃并氧杂蒽酮(bisfuranoxanthone))、海鞘素和其它或相关DNA小沟烷化剂。

[0369] 在一个实施方案中,Z是螯合的金属,诸如配位数为2至8(包括端值)的正二价或正三价金属的螯合物。此类金属的特定示例包括锝(Tc)、铼(Re)、钴(Co)、铜(Cu)、金(Au)、银(Ag)、铅(Pb)、铋(Bi)、铟(In)、镓(Ga)、钇(Y)、铽(Tb)、钆(Gd)和钪(Sc)。一般来讲,金属优选为放射性核素。特定的放射性核素包括^{99m}Tc、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵⁸Co、⁶⁰Co、⁶⁷Cu、¹⁹⁵Au、¹⁹⁹Au、¹¹⁰Ag、²⁰³Pb、²⁰⁶Bi、²⁰⁷Bi、¹¹¹In、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁸Y、⁹⁰Y、¹⁶⁰Tb、¹⁵³Gd和⁴⁷Sc。螯合的金属可以是例如与任何合适的多齿螯合剂(例如,无环或环状多胺、聚醚(例如,冠醚及其衍生物))螯合的以上类型的金属中的一种;聚酰胺;卟啉类;和碳环衍生物。

[0370] 抗Nectin-4抗体或抗体片段也可以用于诊断,例如,以检测Nectin-4肿瘤细胞。在此类实施方案中,抗体或抗体片段可缀合至效应分子,诸如可用于例如诊断的可检测物质。可检测物质的示例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性核素、正电子发射金属(用于正电子发射断层扫描)和非放射性顺磁性金属离子。关于可缀合至抗体以用作诊断剂的金属离子,大体参见美国专利第4,741,900号。合适的酶包括辣根过氧化物

酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶；合适的辅基包括链霉素亲和素、亲和素和生物素；合适的荧光材料包括伞形酮(umbelliferone)、萤光素、异硫氰酸萤光素、罗丹明、二氯三嗪基胺萤光素、丹磺酰氯和藻红蛋白(phycoerythrin)；合适的发光材料包括鲁米诺(luminol)；合适的生物发光材料包括荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白；并且合适的放射性核素包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 和 ^{99}Tc 。

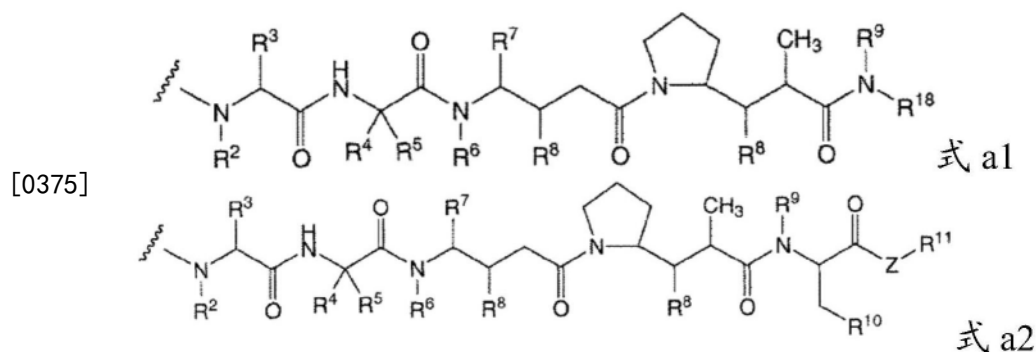
[0371] 在一个实施方案中，细胞毒性剂(Z)是DNA小沟结合和/或烷化剂，例如吡咯并苯并二氮卓、倍癌霉素或其衍生物。

[0372] 在另一个实施方案中，细胞毒性剂选自由以下组成的组：紫杉烷类、蒽环类、喜树碱类、埃博霉素类、丝裂霉素类、康普瑞汀类、长春花生物碱类、氮芥类、美登木素类、卡奇霉素类、倍癌霉素类、微管溶素类、尾海兔素类和澳瑞他汀类、烯二炔类、鹅膏毒素类(amatoxins)、吡咯并苯二氮卓类、乙烯亚胺类、放射性同位素、治疗性蛋白和多肽以及毒素或其片段。

[0373] 在另一个实施方案中，细胞毒性剂选自环磷酰胺、异环磷酰胺(ifosfamide)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、4-(双(2-氯乙基)氨基)苯酚、4-(双(2-氟乙基)氨基)苯酚、N,N-双(2-氯乙基)-对苯二胺、N,N-双(2-氟-乙基)-对苯二胺、卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、苏消安(treosulfan)、达卡巴嗪(dacarbazine)、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、长春地辛(vindesine)、长春瑞滨(vinorelbine)、紫杉醇(paclitaxel)、多西他赛(docetaxel)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)、拓扑替康、伊立替康(irinotecan)、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、勒托替康、喜树碱(camptothecin)、克雷斯托(crisnatol)、丝裂霉素C(mitomycin C)、丝裂霉素A(mitomycin A)、甲氨蝶呤(methotrexate)、三甲曲沙(trimetrexate)、霉酚酸(mycophenolic acid)、噻唑呋林(tiazofurin)、利巴韦林(ribavirin)、羟基脲(hydroxyurea)、去铁胺(deferoxamine)、5-氟尿嘧啶、氟尿苷、去氧氟尿苷(doxifluridine)、雷替曲塞(raltitrexed)、阿糖胞苷(cytarabine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(cytosine arabinoside)、氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、雷洛昔芬(raloxifen)、甲地孕酮(megestrol)、戈舍瑞林(goserelin)、醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)、氟他胺(flutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、维替泊芬(vertoporfin)、酞菁(phthalocyanine)、光敏剂Pc4、demethoxy-hypocrellin A、干扰素- α 、干扰素- γ 、肿瘤坏死因子、洛伐他汀(lovastatin)、十字孢碱(staurosporine)、放线菌素D(actinomycin D)、博来霉素A2(bleomycin A2)、博来霉素B2(bleomycin B2)、培洛霉素(peplomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、N-(5,5-二乙酰氧基苯基)多柔比星、吗啉代多柔比星、伊达比星(idarubicin)、表柔比星(epirubicin)、吡柔比星(pirarubicin)、佐柔比星(zorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、毒胡萝卜素(thapsigargin)、 N^8 -乙酰基精胺、他利霉素(tallysomyacin)、埃斯波霉素(esperamycin)、丁酸、视黄酸、1,8-二羟基双环[7.3.1]十三碳-4-烯-2,6-二炔-13-酮、蛇形菌素(anguidine)、足叶草毒素(podophyllotoxin)、康普瑞汀A-4、水鬼蕉碱(pancratistatin)、微管溶素A、微管溶素D、洋红霉素(carminomycin)、链霉黑素(streptonigrin)、依利醋铵(elliptmium acetate)、美登素(maytansine)、美登醇(maytansinol)、卡奇霉素、mertansine(DM1)、N-乙酰基- γ_1^1 -卡奇霉素、卡奇霉素- γ_1^1 、卡

奇霉素- α_2^1 、卡奇霉素- α_3^1 、倍癌霉素SA、倍癌霉素A、CC-1065、CBI-TMI、倍癌霉素C2、倍癌霉素B2、centanamycin、尾海兔素、澳瑞他汀E、单甲基澳瑞他汀E (MMAE)、单甲基澳瑞他汀F (MMAF)、 α -鹅膏蕈碱(α -amanitin)、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、鹅膏素(amanin)、鹅膏酰胺(amaninamide)、鹅膏无毒环肽(amanullin)和鹅膏蕈酸(amanullinic acid)以及它们的衍生物。

[0374] 示例性澳瑞他汀实施方案包括N末端连接的单甲基澳瑞他汀药物部分,其包含下式(a1)和(a2)中任一个的结构:



[0376] 其中(a1)和(a2)的波浪线表示与接头(例如,接头X或部分Y、Pep或Y')的共价连接位点,并且在每个位置处独立地:

[0377] R^2 选自H和 C_1 - C_8 烷基;

[0378] R^3 选自H、 C_1 - C_8 烷基、 C_1 - C_8 碳环、芳基、 C_1 - C_8 烷基-芳基、 C_1 - C_8 烷基- (C_3 - C_8 碳环)、 C_3 - C_8 杂环和 C_1 - C_8 烷基- (C_3 - C_8 杂环);

[0379] R^4 选自H、 C_1 - C_8 烷基、 C_1 - C_8 碳环、芳基、 C_1 - C_8 烷基-芳基、 C_1 - C_8 烷基- (C_3 - C_8 碳环)、 C_3 - C_8 杂环和 C_1 - C_8 烷基- (C_3 - C_8 杂环);

[0380] R^5 选自H和甲基;

[0381] 或者 R^4 和 R^5 共同形成碳环并且具有式- (CR^aR^b) $_n$,其中 R^a 和 R^b 独立地选自H、 C_1 - C_8 烷基和 C_3 - C_8 碳环,并且n选自2、3、4、5和6;

[0382] R^6 选自H和 C_1 - C_8 烷基;

[0383] R^7 选自H、 C_1 - C_8 烷基、 C_3 - C_8 碳环、芳基、 C_1 - C_8 烷基-芳基、 C_1 - C_8 烷基- (C_3 - C_8 碳环)、 C_3 - C_8 杂环和 C_1 - C_8 烷基- (C_3 - C_8 杂环);

[0384] 每个 R^8 独立地选自H、OH、 C_1 - C_8 烷基、 C_3 - C_8 碳环和O- (C_1 - C_8 烷基);

[0385] R^9 选自H和 C_1 - C_8 烷基;

[0386] R^{10} 选自芳基或 C_3 - C_8 杂环;

[0387] Z是O、S、NH或 NR^{12} ,其中 R^{12} 是 C_1 - C_8 烷基;

[0388] R^{11} 选自H、 C_1 - C_{20} 烷基、芳基、 C_3 - C_8 杂环、- ($R^{13}O$) $_m$ - R^{14} 或- ($R^{13}O$) $_m$ -CH (R^{15}) $_2$;m是1-1000的整数;

[0389] R^{13} 是 C_2 - C_8 烷基;

[0390] R^{14} 是H或 C_1 - C_8 烷基;

[0391] R^{15} 每次出现时独立地为H、COOH、- (CH_2) $_n$ -N (R^{16}) $_2$ 、- (CH_2) $_n$ -SO $_3$ - C_1 - C_8 烷基;

[0392] R^{16} 每次出现时独立地为H、 C_1 - C_8 烷基或- (CH_2) $_n$ -COOH;

[0393] R^{18} 选自- C (R^8) $_2$ -C (R^8) $_2$ -芳基、- C (R^8) $_2$ -C (R^8) $_2$ - (C_3 - C_8 杂环) 和

[0394] $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8\text{碳环})$; 并且

[0395] n 是0至6的整数。

[0396] 在一个实施方案中, R^3 、 R^4 和 R^7 独立地为异丙基或仲丁基并且 R^5 为-H或甲基。在示例性实施方案中。 R^3 和 R^4 各自为异丙基, R^5 为-H, 并且 R^7 为仲丁基。

[0397] 在又一个实施方案中, R^2 和 R^6 各自为甲基, 并且 R^9 为-H。

[0398] 在仍另一个实施方案中, R^8 每次出现时为 $-OCH_3$ 。

[0399] 在示例性实施方案中, R^3 和 R^4 各自为异丙基, R^2 和 R^6 各自为甲基, R^5 为-H, R^7 为仲丁基, R^8 每次出现时为 $-OCH_3$, 并且 R^9 为-H。

[0400] 在一个实施方案中, Z 为-O-或-NH-。

[0401] 在一个实施方案中, R^{10} 为芳基。

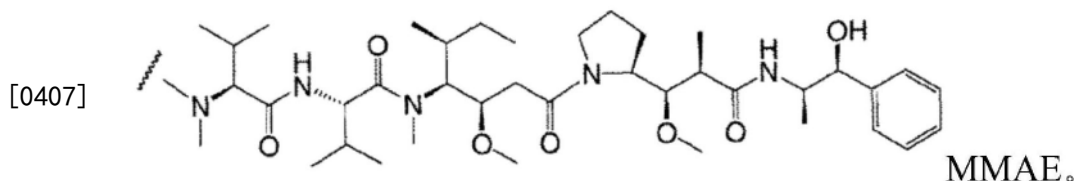
[0402] 在示例性实施方案中, R^{10} 为-苯基。

[0403] 在示例性实施方案中, 当 Z 为-O-时, R^{11} 为-H、甲基或叔丁基。

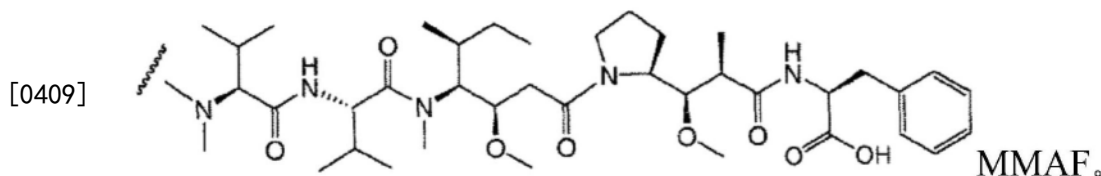
[0404] 在一个实施方案中, 当 Z 为-NH时, R^{11} 为 $-CH(R^{15})_2$, 其中 R^{15} 为 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, 并且 R^{16} 为 $-C_1-C_8$ 烷基或 $-(CH_2)_n-COOH$ 。

[0405] 在另一个实施方案中, 当 Z 为-NH时, R^{11} 为 $-CH(R^{15})_2$, 其中 R^{15} 为 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 。

[0406] 式(a1)的一个示例性澳瑞他汀实施方案是MMAE, 其中波浪线表示与接头的共价连接:

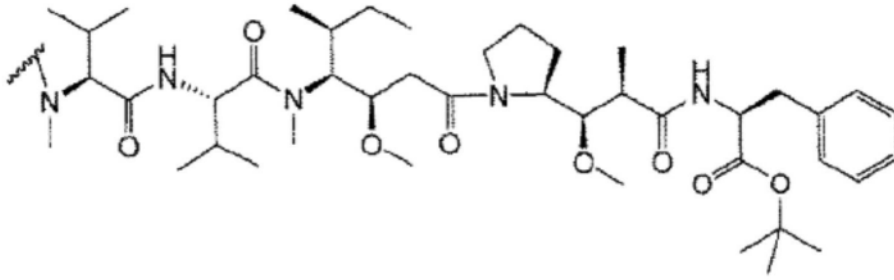


[0408] 式(a2)的示例性澳瑞他汀实施方案是MMAF, 其中波浪线指示与抗体-药物缀合物的接头(L)的共价连接(参见US 2005/0238649和Doronina等人(2006)《生物缀合化学(Bioconjugate Chem.)》17:114-124):

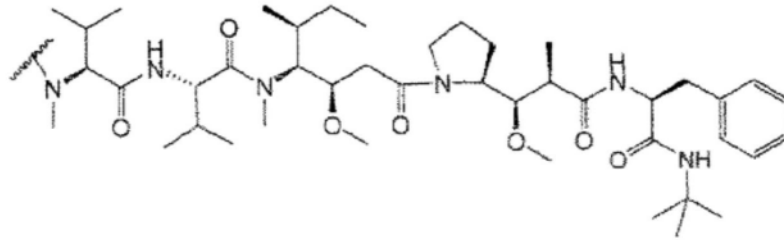


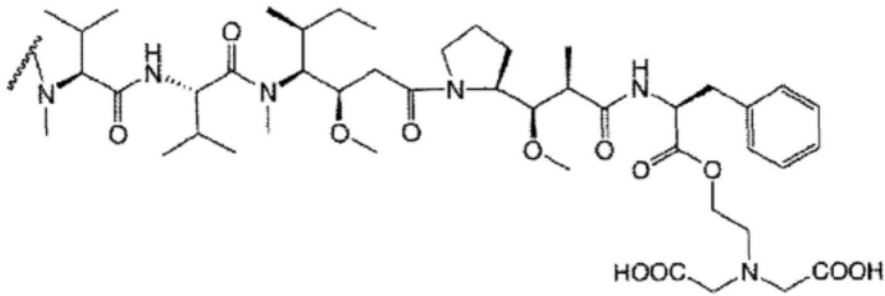
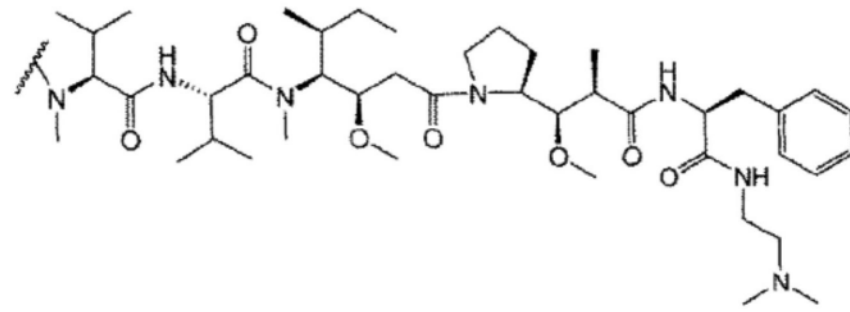
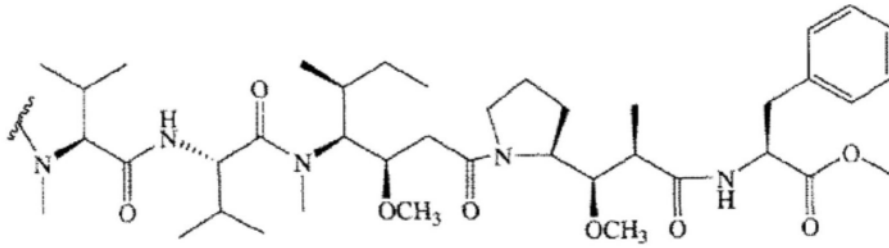
[0410] 其它示例性Z实施方案包括在五肽澳瑞他汀药物部分的C末端具有苯丙氨酸羧基修饰的单甲基缬氨酸化合物(WO 2007/008848)和在五肽澳瑞他汀药物部分的C末端具有苯丙氨酸侧链修饰的单甲基缬氨酸化合物(WO 2007/008603)。

[0411] 其它药物部分包括以下MMAF衍生物, 其中波浪线指示与接头的共价连接:

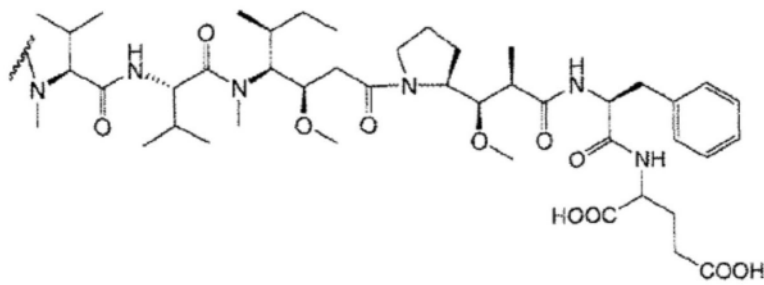
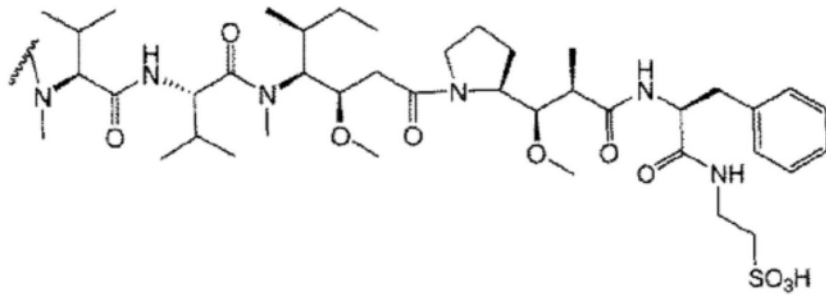


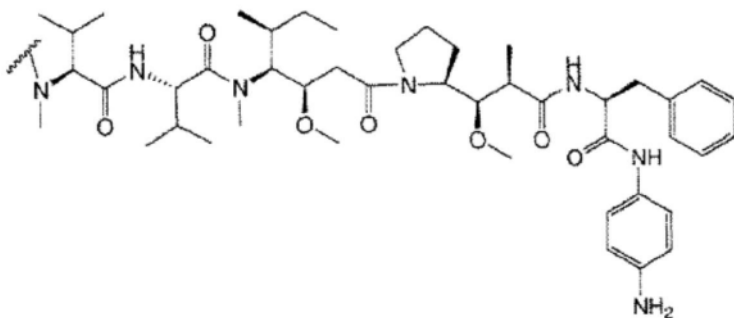
[0412]





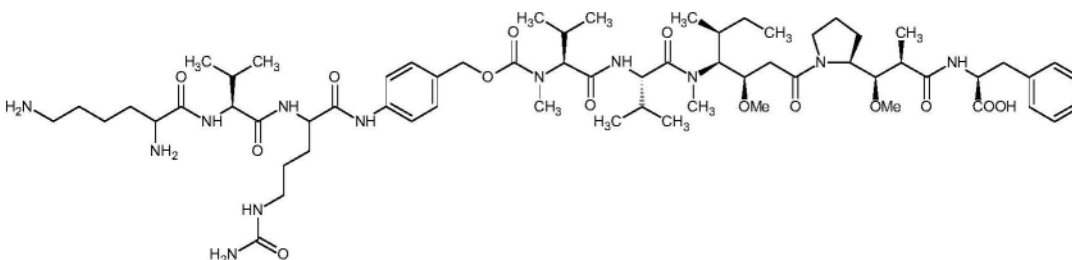
[0413]





[0414]

[0415] 包含间隔子(Y)的接头的示例如下所示,该间隔子(Y)包含伯胺、作为(Pep)部分的缬氨酸-瓜氨酸、作为(Y')部分的PAB以及作为(Z)部分的MMAF:

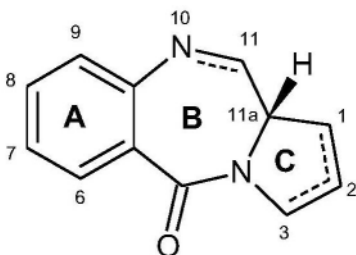


[0416]

[0417] 在一个实施方案中,Z部分是DNA小沟结合剂,任选地Z包含吡咯并苯并二氮卓(PBD)。在一个实施方案中,Z是吡咯并苯并二氮卓单体。在一个实施方案中,Z是包含两个吡咯并苯并二氮卓单元的吡咯并苯并二氮卓二聚体。在一个实施方案中,Z是包含三个吡咯并苯并二氮卓单元的吡咯并苯并二氮卓三聚体。在一个实施方案中,Z是包含多于三个吡咯并苯并二氮卓单元的吡咯并苯并二氮卓多聚体。PBD的结构以及式和其生产方法描述于例如以下PCT公布:第W0 2013/177481号、第W0 2011/130616号、第W0 2004/043880号、第W0 2005/085251号、第W02012/112687和第W0 2011/023883号中,其各自的公开内容通过引用并入本文。

[0418] 吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓是与鸟嘌呤残基共价连接的序列选择性小沟结合DNA-相互作用剂家族。据报道,PBD的C11a位置处的S-手性为它们提供了适当的三维形状以完美地适合DNA小沟。PBD可具有不同的效果和作用模式。PBD可以是不引起DNA交联的DNA结合剂或DNA烷化剂,或者PBD可以是DNA交联剂。

[0419] 吡咯并苯并二氮卓单元或单体可具有如下通式结构:



[0420]

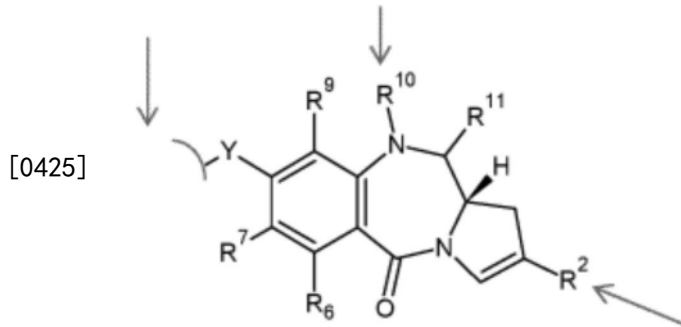
[0421] 其中PBD可以在芳族A环和吡咯并C环两者中具有不同数量、类型和位置的取代基,并且可以在C环的饱和度方面变化。在B环中,在N¹⁰-C¹¹位置存在亚胺(N=C)、甲醇胺(NH-CH(OH))或甲醇胺甲基醚(NH-CH(OMe)),其是负责烷化DNA的亲电子中心。

[0422] PBD的生物活性可通过将两个PBD单体或单元连接在一起来增强,通常通过它们的

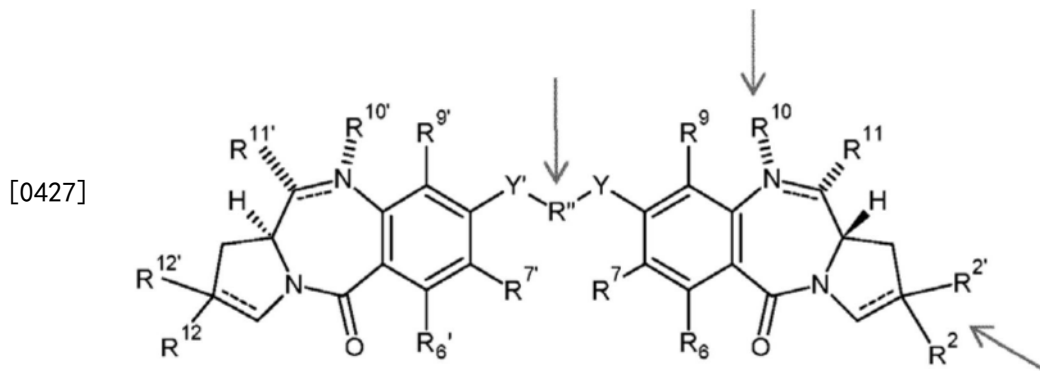
C8/C8'-羟基官能团经由柔性亚烷基接头连接在一起。

[0423] 在本文的任何实施方案的一个方面,吡咯并苯并二氮卓单体或单元是吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓。在本文的任何实施方案的一个方面,吡咯并苯并二氮卓二聚体是C8/C8'-连接的吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓二聚体。

[0424] PBD可通过任何合适的位置附接至接头。例如,PBD可通过下文指示的PBD单元中的任何位置与接头连接。



[0426] 在一个实施方案中,PBD二聚体包含以下通式的结构,其中与化合物内的其它取代基或官能团的示例性附接点由箭头指示:



[0428] 其中:

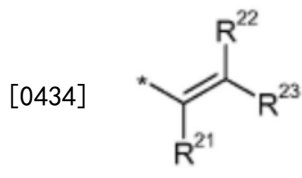
[0429] R¹²和R^{12'}和/或R²和R^{2'}分别一起形成双键=CH₂或=CH-CH₃;或

[0430] R²和R^{12'}不存在,并且R²和R¹²独立地选自:

[0431] (iia) C₁₋₅饱和脂族烷基;

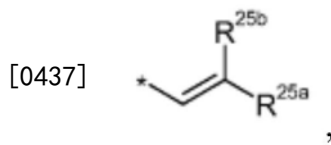
[0432] (iib) C₃₋₆饱和环烷基;

[0433] (iic)



[0435] 其中R²¹、R²²和R²³各自独立地选自H、C₁₋₃饱和烷基、C₂₋₃烯基、C₂₋₃炔基和环丙基,其中R¹²基团中的碳原子总数不超过5;

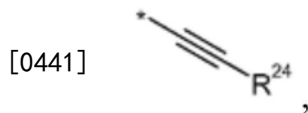
[0436] (iic)



[0438] 其中 R^{25a} 和 R^{25b} 中的一者为H,并且另一者选自:

[0439] 苯基,该苯基任选地被选自卤素、甲基、甲氧基的基团取代;吡啶基;和噻吩基;以及

[0440] (iie)



[0442] 其中 R^{24} 选自:H; C_{1-3} 饱和烷基; C_{2-3} 烯基; C_{2-3} 炔基;环丙基;苯基,该苯基任选地被选自卤素、甲基、甲氧基的基团取代;吡啶基;和噻吩基;

[0443] R^6 和 R^9 独立地选自H、R、OH、OR、SH、SR、 NH_2 、NHR、NRR'、硝基、 Me_3Sn 和卤基;其中R和R'独立地选自任选取代的 C_{1-12} 烷基、 C_{3-20} 杂环基和 C_{5-20} 芳基;

[0444] R^7 选自H、R、OH、OR、SH、SR、 NH_2 、NHR、NHR'、硝基、 Me_3Sn 和卤基;

[0445] 或者:

[0446] (a) R^{10} 为H,并且 R^{11} 为OH、 OR^A ,其中 R^A 为烷基;

[0447] (b) R^{10} 和 R^{11} 在它们所结合的氮和碳原子之间形成氮-碳双键;或

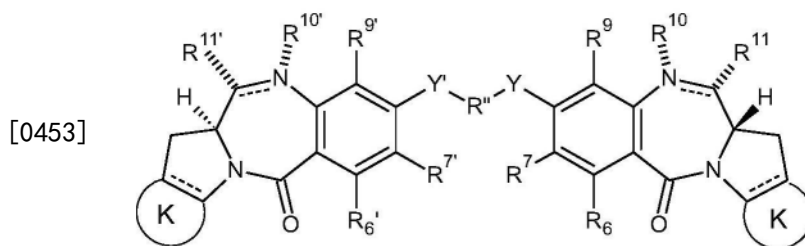
[0448] (c) R^{10} 为H,并且 R^{11} 为 SO_zM ,其中z为2或3,并且M为单价药学上可接受的阳离子;

[0449] R'' 为 C_{3-12} 亚烷基,该链可被以下中断:一个或多个杂原子,例如O、S、 NR^{N2} (其中 R^{N2} 为H或 C_{1-4} 烷基),和/或芳环,例如苯或吡啶;

[0450] Y和Y'选自O、S或NH;以及

[0451] $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^{9'}$ 分别选自与 R^6 、 R^7 和 R^9 相同的基团,并且 $R^{10'}$ 和 $R^{11'}$ 与 R^{10} 和 R^{11} 相同,其中如果 R^{10} 和 R^{11} 为 SO_zM ,则M表示二价药学上可接受的阳离子。

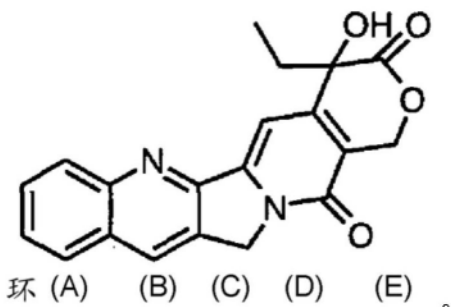
[0452] 在另一个示例中,PBD二聚体包含以下通式的结构:



[0454] 其中 R^6 、 R^7 、 R^9 、 $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^{9'}$ 、 R^{10} 、 R^{11} 、 $R^{10'}$ 和 $R^{11'}$ 如上文所定义,并且其中“K”环是取代的或未取代的芳环或非芳环,任选地6元环,任选地苯基。

[0455] 在一个实施方案中,细胞毒性剂(Z)是喜树碱,例如其具有或包含喜树碱或喜树碱类似物的结构。喜树碱是众所周知的,广泛的喜树碱类似物也是众所周知的,这些喜树碱类似物共享具有各种取代的核心环系统,但优选地在以下基本喜树碱结构中的环A和/或B中具有修饰或取代:

[0456]

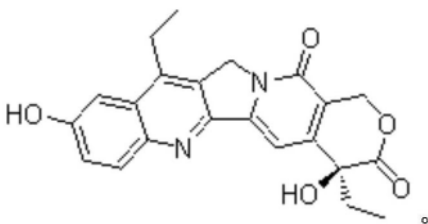


[0457] 已经报道了许多喜树碱类似物,包括拓扑替康、伊立替康、依喜替康、DXd、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、勒托替康、喜树碱、吉马替康、贝洛替康和鲁比替康。另外的喜树碱类似物公开于Li等人,《ACS药物化学快报 (ACS Med.Chem.Lett.)》2019, 10,10,1386-1392,《日本癌症研究杂志 (Jpn.J.Cancer Res.)》86:776-782和Takiguchi等人1997《日本癌症研究杂志 (Jpn.J.Cancer Res.)》88:760-769中,这些文献的公开内容通过引用并入本文。四种类似物拓扑替康、伊立替康、贝洛替康和DXd(作为德卢替康-曲妥珠单抗的一部分)已获得FDA批准。在一个实施方案中,喜树碱类似物是五环化合物(例如,喜树碱缺少F环)。在一个实施方案中,喜树碱类似物是六环化合物,例如,包括F环。

[0458] 一些示例诸如基本喜树碱结构SN-38分子(7-乙基-10-羟基喜树碱;伊立替康的活性代谢物),并且Li等人,《ACS药物化学快报 (ACS Med.Chem.Lett.)》2019,10,10,1386-1392中公开的喜树碱类似物具有五个环(A、B、C、D和E环)并且可以例如通过B环上的取代基附接到接头(例如间隔子Y或Y',或接头X)。

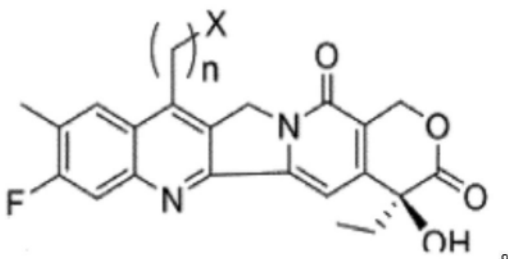
[0459] SN-38:

[0460]



[0461] Li等人,《ACS药物化学快报 (ACS Med.Chem.Lett.)》2019,10,10,1386-139的化合物:

[0462]



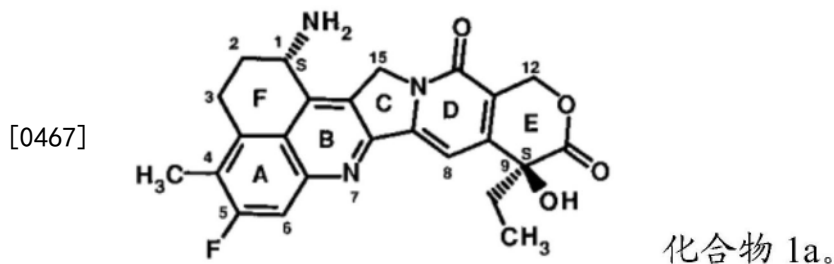
[0463] 任选地,喜树碱类似物是六环化合物(另外的F环),其中化合物通过这种F环上的取代基附接到接头。此类六环化合物的示例包括但不限于DXd(目录号:1599440-33-1)和依喜替康。

[0464] 因此喜树碱类似物包括依喜替康、SN-38和包含此类部分的一系列分子中的任何一种分子,例如依喜替康可以未经取代或可以在位置1的胺处被取代,例如其中取代基是或包含 $-C(=O)-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-O-CH_2-C(=O)-$ 、 $-HO-O-CH_2-C(=O)-$ 、 $-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、-

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ 基团或美国专利第6,835,807号中所示的其它基团,该美国专利的公开内容通过引用并入本文。

[0465] 在一个实施方案中,本公开的抗体在存在Nectin-4表达性肿瘤细胞的情况下(例如,在对可切割部分进行酶促切割随后进行间隔子Y'的自消除时)在体内或体外释放具有化合物1的结构的依喜替康分子。

[0466] 喜树碱衍生物或类似物依喜替康描述于Mitsui等人1995《日本癌症研究杂志(Jpn.J.Cancer Res.)》86:776-782和Takiguchi等人1997《日本癌症研究杂志(Jpn.J.Cancer Res.)》88:760-769中,这些文献的公开内容通过引用并入本文。依喜替康的结构如以下化合物1a中所示:



[0468] 依喜替康可以通过位置1处的氨基的氮原子与接头偶联,使得当依喜替康部分与接头结合或存在于接头-依喜替康分子(X-Z)分子内时,例如与抗体缀合时,依喜替康将具有化合物1b的结构:

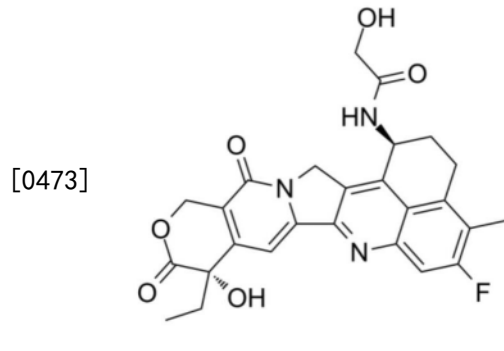


[0470] 因此,应当理解,当化合物1a的依喜替康通过位置1处的胺附接至接头时(并且,例如,当接头进而附接至抗体时),依喜替康将被理解为位置1处的经修饰的基团(即位置1处的 NH_2 基团被 NH ,或可替代地被 OH 或 O 基团替换)。例如,依喜替康可以通过包括可切割寡肽的接头与抗体偶联。示例包含二肽、三肽、四肽和五肽,如美国专利第6,835,807号中所示的含甘氨酸和苯丙氨酸的肽,或附接至PAB分子的二肽缬氨酸-瓜氨酸或缬氨酸-丙氨酸,或所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。已知各种合适的接头-Z结构可以在位置1的氨基处释放活性依喜替康或依喜替康衍生物。如式VII、VIII和IX中或实施例7的(PEG(8U)-Val-Ala-PAB-依喜替康)接头中所示,依喜替康可通过附接至位置1的胺的对氨基苄氧羰基(PAB)基团连接至可切割的寡肽,该接头在切割时导致具有化合物1a结构的依喜替康的释放。在一个示例中,如式III和化合物13(Dxd)以及实施例7的ggfg-Dxd接头中所示,依喜替康可通过附接至位置1的胺的($\text{CH}_2\text{-C(=O)}$)基团连接至可切割的寡肽,该接头在切割时导致含有依喜替康的化合物13(Dxd)的释放。化合物1的依喜替康的位置1的 NH 或 NH_2 处的取代基的示例包括 $-\text{C(=O)-}$ 、 $-\text{O-C(=O)-}$,或包含诸如 $-\text{O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ 、 $-\text{HO-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ 的基

团的(CH₂-C(=O))。

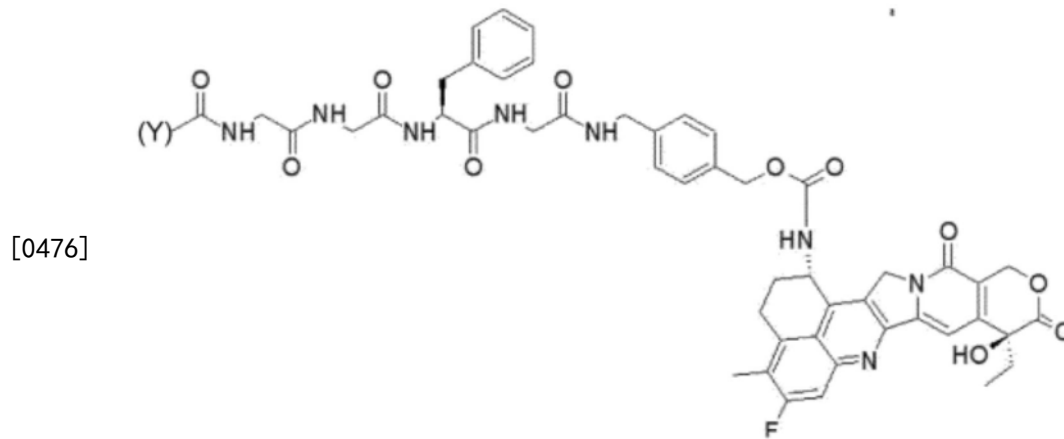
[0471] 在一个实施方案中,经取代的依喜替康衍生物(例如,在位置1处衍生)具有化合物13的结构。

[0472] Dxd的结构在下文示出:



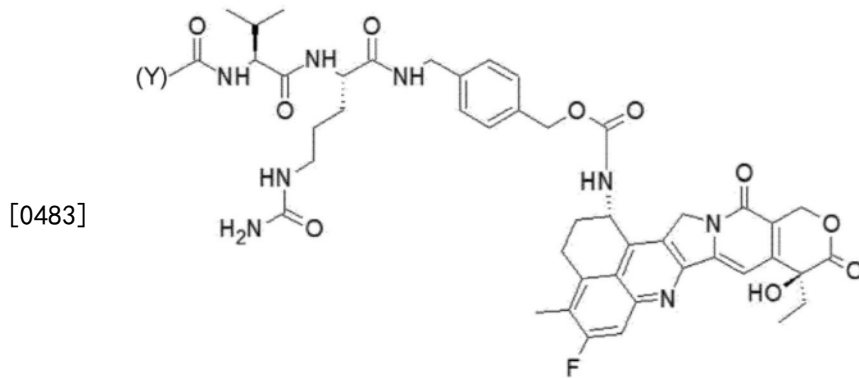
[0474] Dxd可通过碳链末端的氧原子与接头偶联,使得当Dxd部分与接头结合或存在于接头-Dxd分子(X-Z)分子内时,例如与抗体缀合时,碳链末端OH将被O替换。

[0475] 在一个实施方案中,接头部分(X-Z)是或包含以下式VII中所示的结构,其中(Y)是间隔子,该间隔子(例如,在其末端)包含反应性基团(R)与氨基酸残基,例如抗体上的游离氨基、羟基、巯基或羧基反应的残基(例如,一个或多个赖氨酸残基的ε氨基,一个或多个谷氨酸或天冬氨酸残基的游离羧基,或一个或多个半胱氨酸残基的S原子)。用包含式VII或化合物3或4的结构接头官能化的抗Nectin-4结合蛋白将释放或产生(例如在细胞内,在Nectin-4表达性肿瘤细胞的存在下)具有化合物1a的结构化合物。



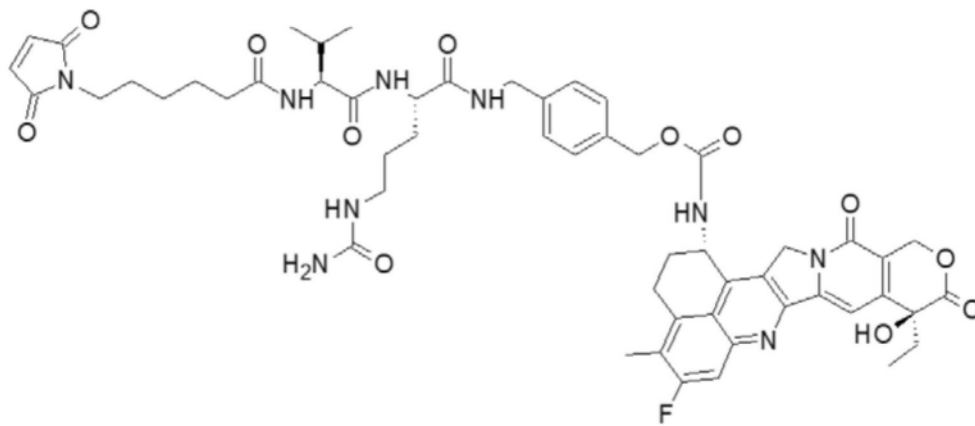
式 VII

[0477] 具有马来酰亚胺作为R基团的示例性接头可以具有以下化合物3的结构。在用还原剂(例如,三(2-羧乙基)膦酸盐)还原链间二硫键后,此类接头可以通过抗体中的半胱氨酸残基与抗体缀合。

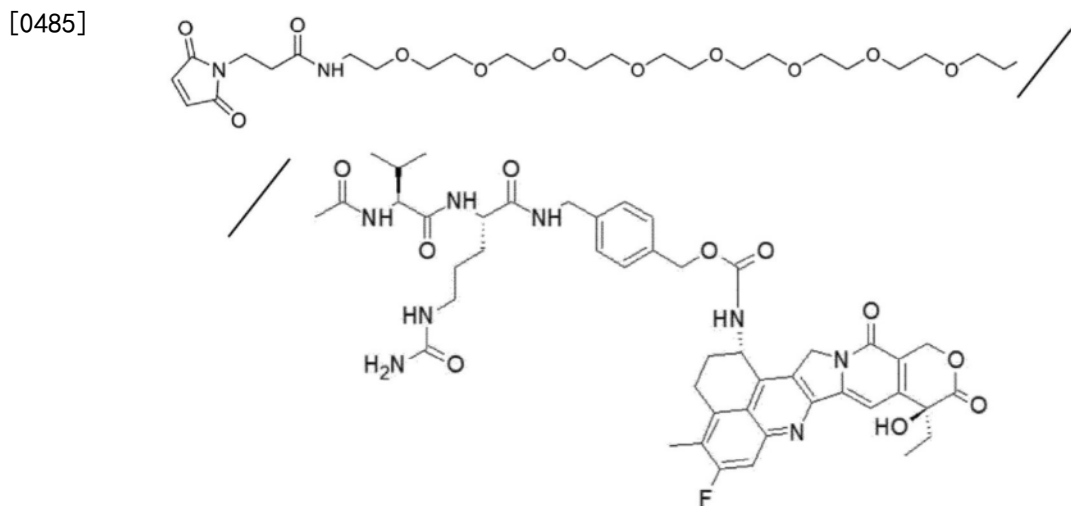


式 VIII

[0484] 具有马来酰亚胺作为R基团的示例性接头可具有以下化合物5或6的结构。在用还原剂还原链间二硫键后,此类接头可以通过抗体中的半胱氨酸残基与抗体缀合。



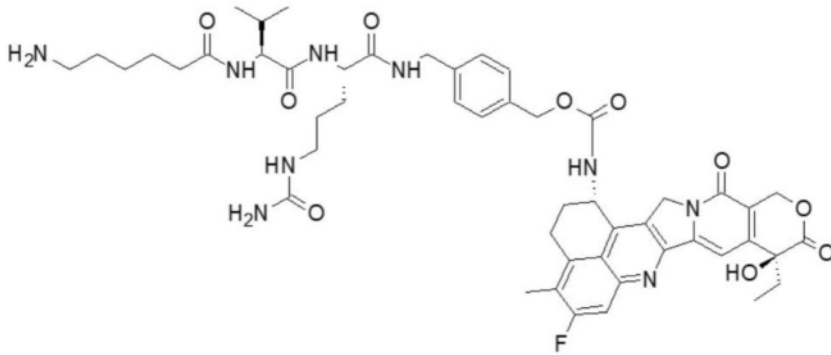
化合物 5



化合物 6

[0486] 在另一个实施方案中,接头可以具有伯胺作为R基团,并且当存在转谷氨酰胺酶的情况下与抗体反应时,可以产生包括用接头官能化的一个或多个受体谷氨酰胺残基的抗体。例如,接头(X-Z)或用该接头官能化的抗体具有或包含如以下化合物7所示的结构:

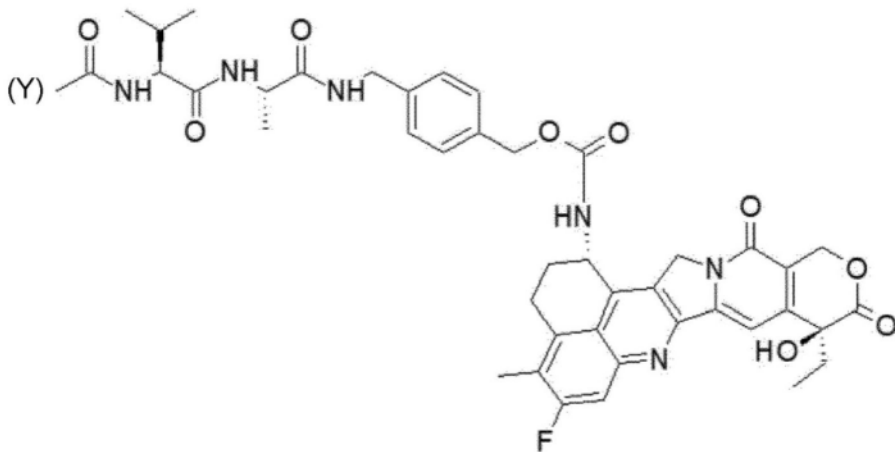
[0487]



化合物 7。

[0488] 在一个实施方案中,接头部分(X-Z)是或包含以下式IX中所示的结构,其中(Y)是间隔子,该间隔子(例如,在其末端)包含反应性基团(R)与氨基酸残基,例如抗体上的游离氨基、羟基、巯基或羧基反应的残基(例如,一个或多个赖氨酸残基的 ϵ 氨基,一个或多个谷氨酸或天冬氨酸残基的游离羧基,或一个或多个半胱氨酸残基的S原子),或例如糖基化氨基酸残基的聚糖结构(例如与抗体的Kabat残基N297结合的天然、截短或以其它方式修饰的N-聚糖)。用包含式IX的结构的接头官能化的抗Nectin-4结合蛋白将释放(例如在细胞内,在Nectin-4表达性肿瘤细胞的存在下)具有化合物Ia的结构化合物。

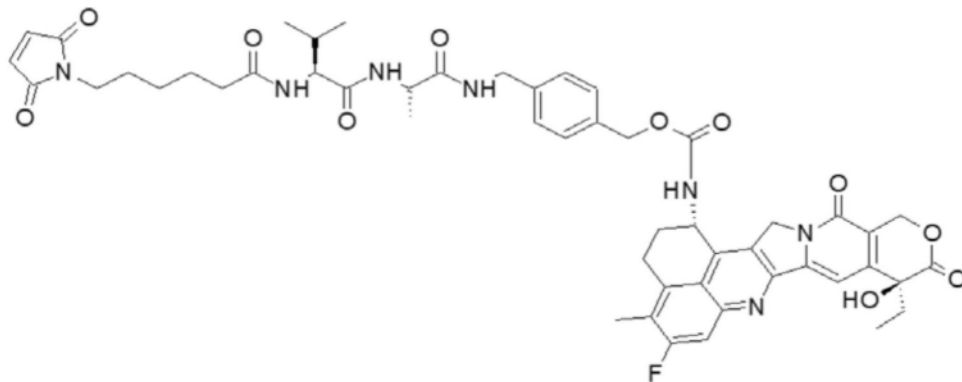
[0489]



式 IX

[0490] 具有马来酰亚胺作为R基团的示例性接头可具有以下化合物8的结构。在用还原剂还原链间二硫键后,此类接头可以通过抗体中的半胱氨酸残基与抗体缀合。

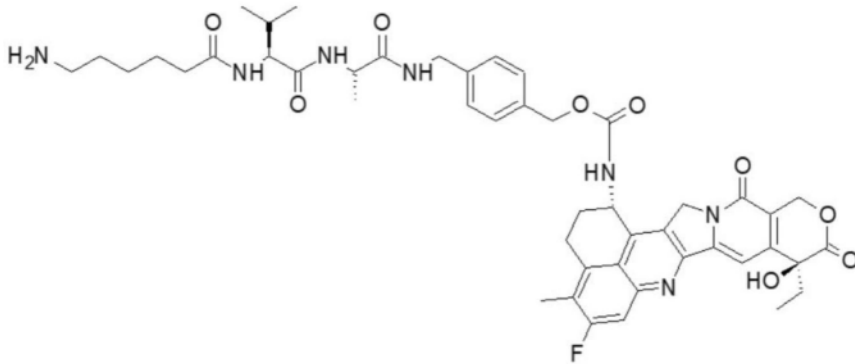
[0491]



化合物 8

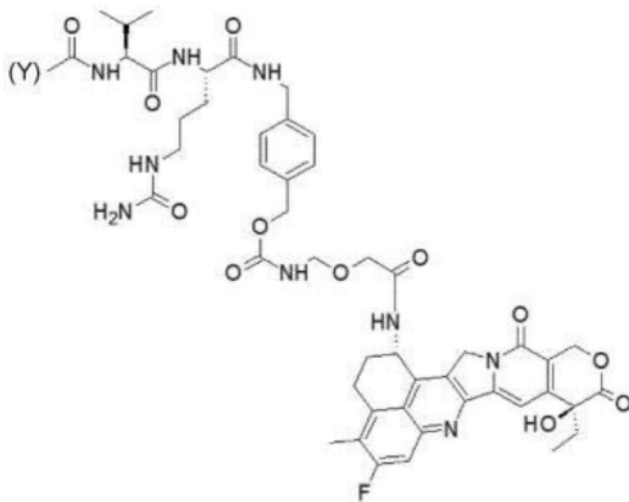
[0492] 在另一个实施方案中,接头可以具有伯胺作为R基团,并且当存在转谷氨酰胺酶

的情况下与抗体反应时,可以产生包括用接头官能化的一个或多个受体谷氨酰胺残基的抗体。例如,接头(X-Z)或用该接头官能化的抗体具有或包含如以下化合物9所示的结构:



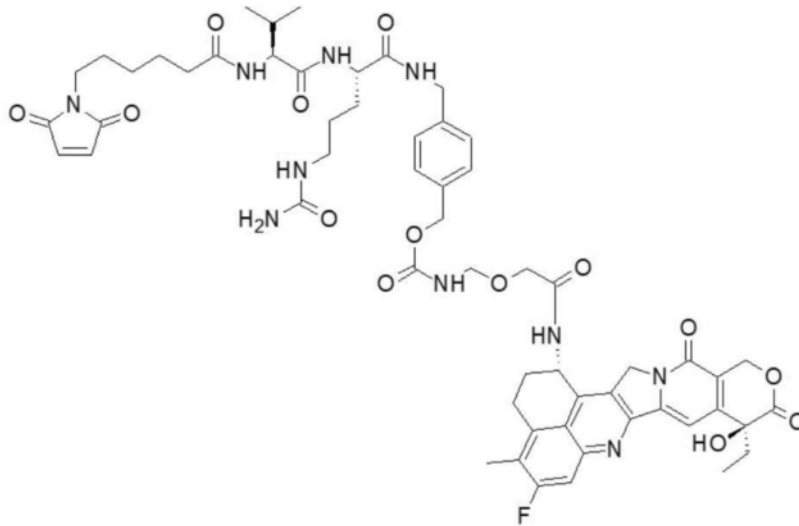
化合物 9。

[0494] 在一个实施方案中,接头部分(X-Z)是或包含以下式X中所示的结构,其中(Y)是间隔子,该间隔子(例如,在其末端)包含反应性基团(R)与氨基酸残基,例如抗体上的游离氨基、羟基、巯基或羧基反应的残基(例如,一个或多个赖氨酸残基的 ϵ 氨基,一个或多个谷氨酸或天冬氨酸残基的游离羧基,或一个或多个半胱氨酸残基的S原子),或例如糖基化氨基酸残基的聚糖结构(例如与抗体的Kabat残基N297结合的天然、截短或以其它方式修饰的N-聚糖)。



式 X

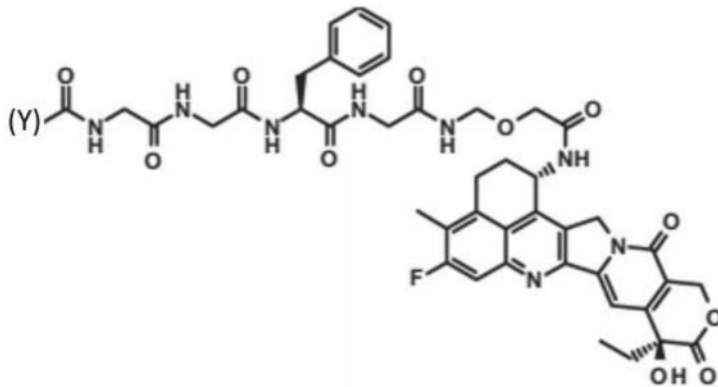
[0496] 具有马来酰亚胺作为R基团的示例性接头可具有以下化合物10的结构。在用还原剂(例如,三(2-羧乙基)膦盐酸盐)还原链间二硫键后,此类接头可以通过抗体中的半胱氨酸残基与抗体缀合。



[0497]

化合物 10

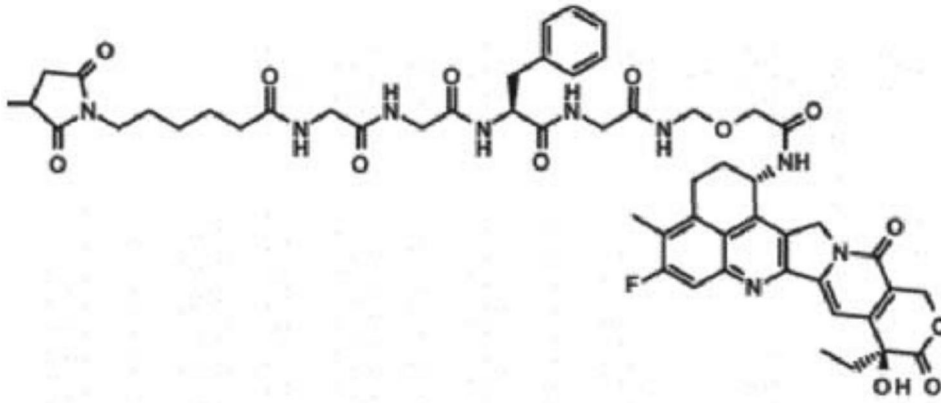
[0498] 在一个实施方案中,接头部分(X-Z)是或包含以下式XI中所示的结构,其中(Y)是间隔子,该间隔子(例如,在其末端)包含反应性基团(R)与氨基酸残基,例如抗体上的游离氨基、羟基、巯基或羧基反应的残基(例如,一个或多个赖氨酸残基的 ϵ 氨基,一个或多个谷氨酸或天冬氨酸残基的游离羧基,或一个或多个半胱氨酸残基的S原子),或例如糖基化氨基酸残基的聚糖结构(例如与抗体的Kabat残基N297结合的天然、截短或以其它方式修饰的N-聚糖)。



[0499]

式 XI

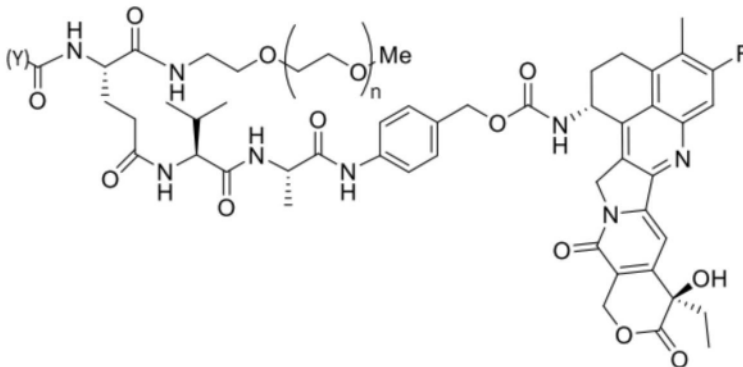
[0500] 具有马来酰亚胺作为R基团的示例性接头可具有以下化合物11的结构。在用还原剂还原链间二硫键后,此类接头可以通过抗体中的半胱氨酸残基与抗体缀合。



[0501]

化合物 11

[0502] 在一个实施方案中,接头部分(X-Z)是或包含根据下式XII的结构,其中(Y)是间隔子,该间隔子(例如,在其末端)包含反应性基团(R)与氨基酸残基,例如抗体上的游离氨基、羟基、巯基或羧基反应的残基(例如,一个或多个赖氨酸残基的 ϵ 氨基,一个或多个谷氨酸或天冬氨酸残基的游离羧基,或一个或多个半胱氨酸残基的S原子),或例如糖基化氨基酸残基的聚糖结构(例如与抗体的Kabat残基N297结合的天然、截短或以其它方式修饰的N-聚糖)。接头可包含例如1-72个、1-16个、1-12个、1-8个、1-7个、1-6个、6-24个、6个、8个、16个、18个或24个PEG单元。在下式中,PEG单元的数量n可以是例如1-72、5-23、1-15、1-16、1-11、1-12、1-8、1-7、1-6、7、15、17或23。

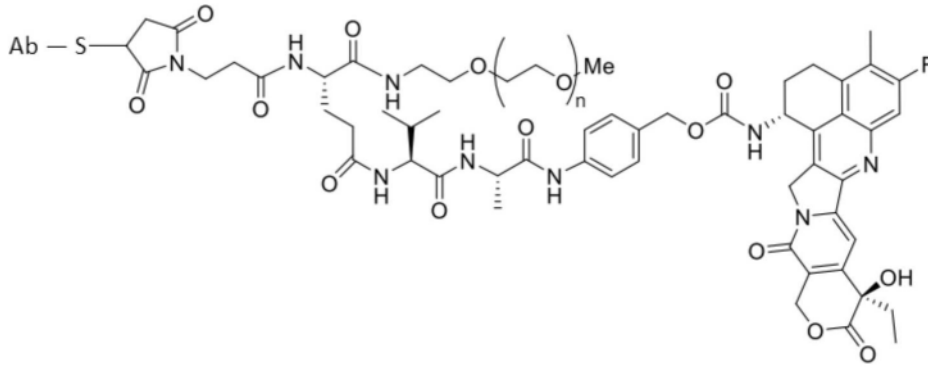


[0503]

式 XII

[0504] 在此类实施方案中,包含具有马来酰亚胺作为R基团的接头部分的免疫缀合物或抗体-药物缀合物可具有式XII bis的结构,其中在用还原剂还原链间二硫键之后,马来酰亚胺部分与抗体(Ab)的氨基酸(即半胱氨酸)的巯基团(S)结合。

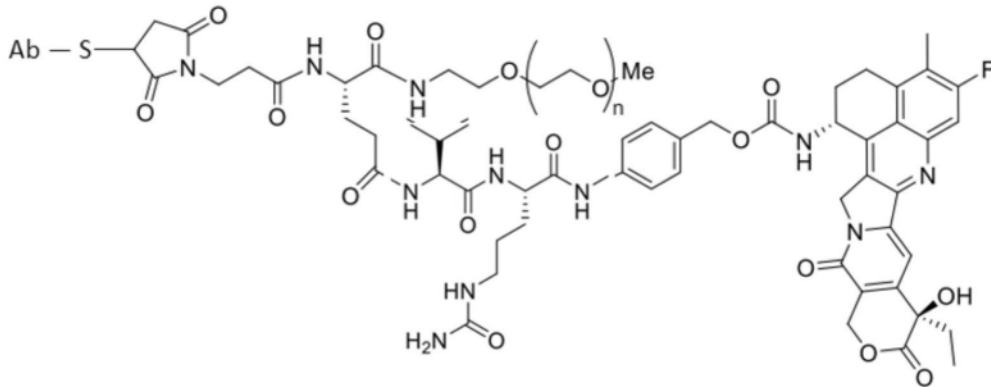
[0505]



式 XII bis

[0506] 在其中细胞内可切割肽是缬氨酸-瓜氨酸的式XII的变体中,包含具有马来酰亚胺作为R基团的接头部分的免疫缀合物或抗体-药物缀合物可具有式XIIter的结构:

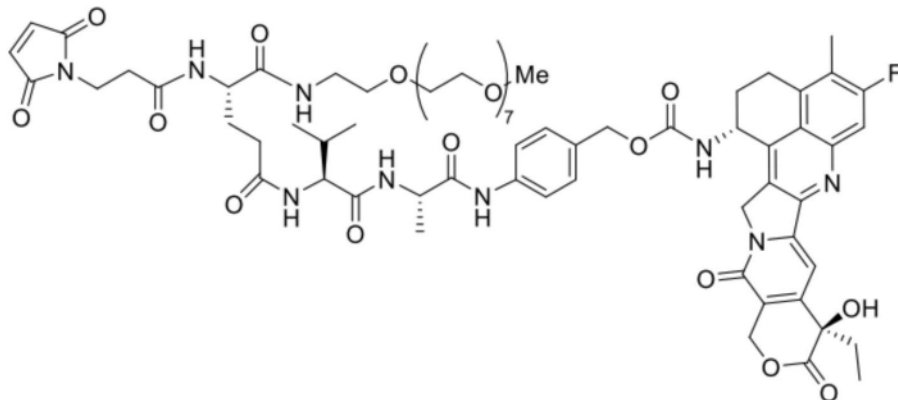
[0507]



式 XIIter

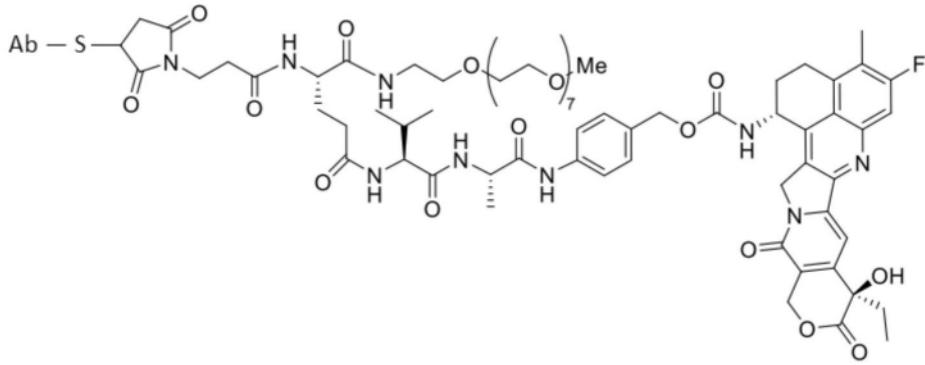
[0508] 具有马来酰亚胺作为R基团的示例性接头可具有以下化合物14a的结构。在用还原剂还原链间二硫键后,此类接头可以通过抗体中的半胱氨酸残基与抗体缀合。在该示例中,接头部分包含8个PEG单元。

[0509]



化合物 14a

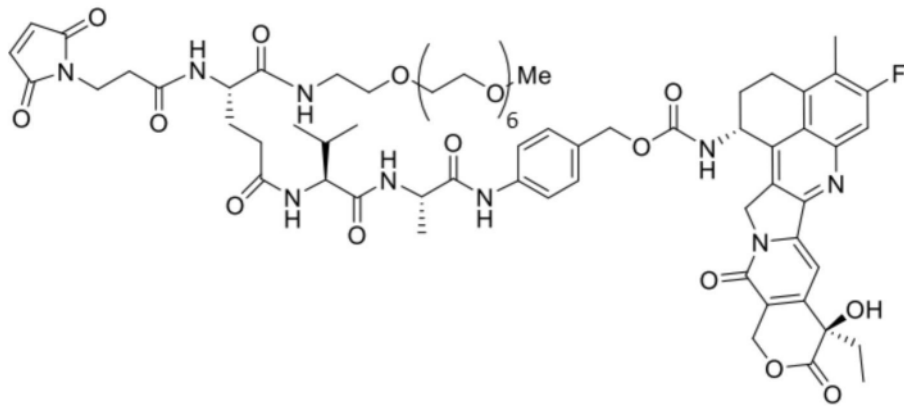
[0510] 根据该实施例,包含此类接头部分的一种免疫缀合物或一种抗体-药物缀合物可具有以下化合物14a bis的结构。



[0511]

化合物 14a bis

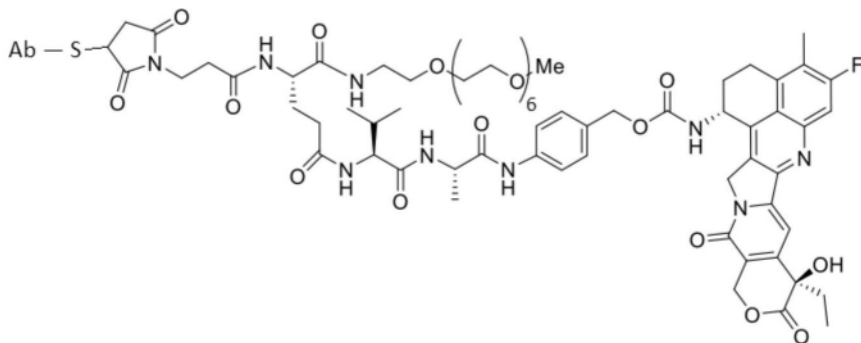
[0512] 具有马来酰亚胺作为R基团的另一示例性接头可具有以下化合物14b的结构。在用还原剂还原链间二硫键后,此类接头可以通过抗体中的半胱氨酸残基与抗体缀合。在该示例中,接头部分包含7个PEG单元。



[0513]

化合物 14b

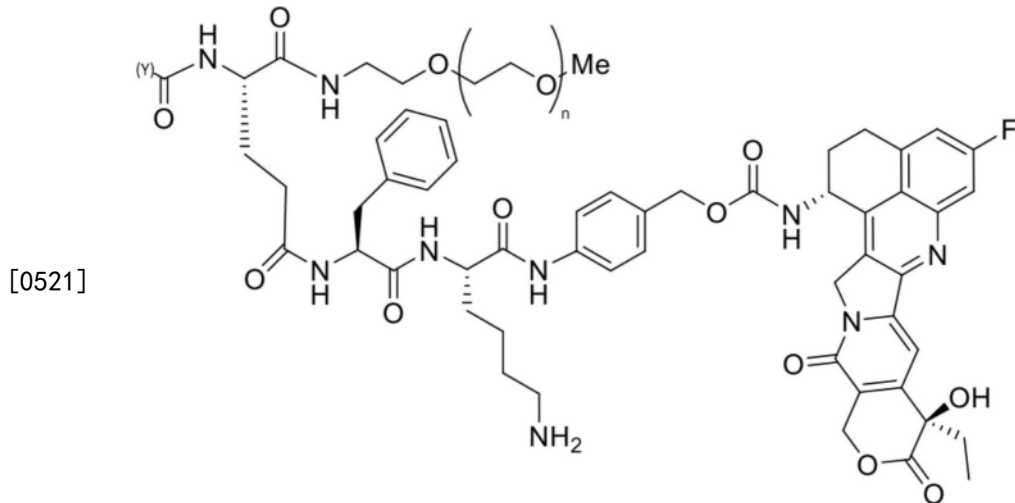
[0514] 根据该实施例,包含此类接头部分的一种免疫缀合物或一种抗体-药物缀合物可具有以下化合物14b bis的结构。



[0515]

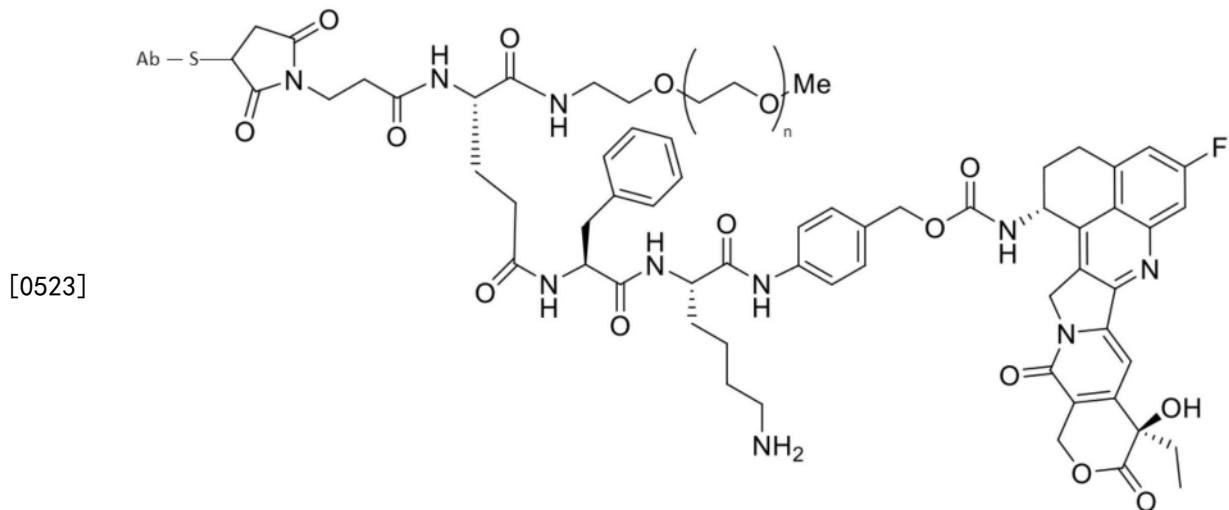
化合物 14b bis

[0516] 具有马来酰亚胺作为R基团的另一示例性接头可具有以下化合物14c的结构。在用还原剂还原链间二硫键后,此类接头可以通过抗体中的半胱氨酸残基与抗体缀合。在该示例中,接头部分包含16个PEG单元。



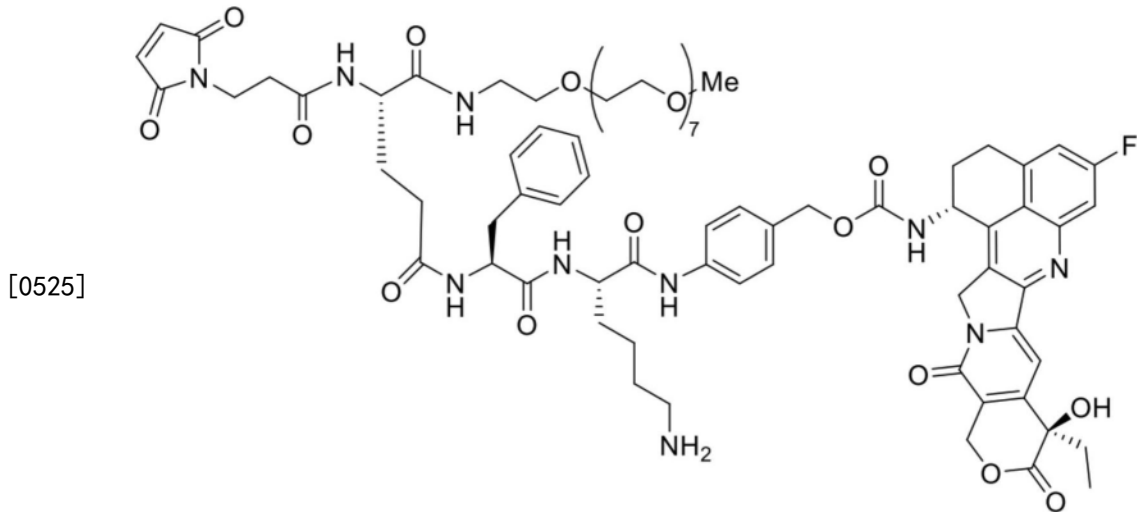
式 XIII

[0522] 在此类实施方案中,包含具有马来酰亚胺作为R基团的接头部分的免疫缀合物或抗体-药物缀合物可具有以下式XIII bis,其中在用还原剂还原链间二硫键之后,马来酰亚胺部分与抗体(Ab)的氨基酸(即半胱氨酸)的硫基团(S)结合。



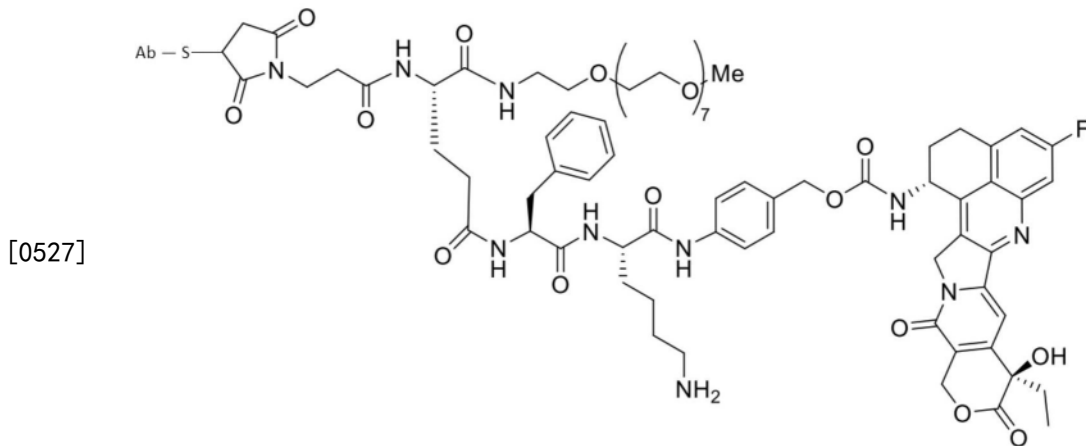
式 XIII bis

[0524] 具有马来酰亚胺作为R基团的示例性接头可具有以下化合物15a的结构。在用还原剂还原链间二硫键后,此类接头可以通过抗体中的半胱氨酸残基与抗体缀合。在该示例中,接头部分包含8个PEG单元。



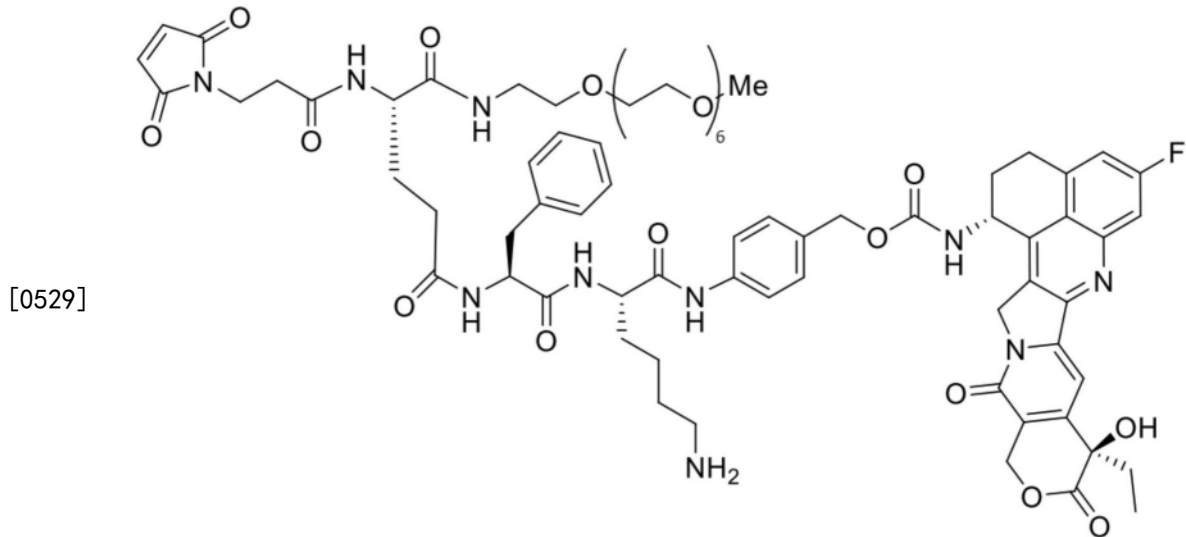
化合物 15a

[0526] 根据该实施例,包含此类接头部分的免疫缀合物或抗体-药物缀合物可具有以下化合物15a bis的结构。



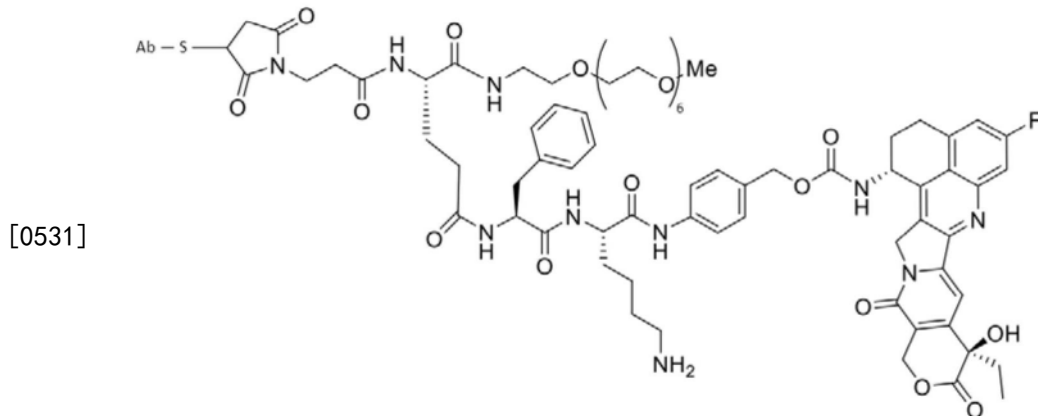
化合物 15a bis

[0528] 具有马来酰亚胺作为R基团的另一示例性接头可具有以下化合物15b的结构。在用还原剂还原链间二硫键后,此类接头可以通过抗体中的半胱氨酸残基与抗体缀合。在该示例中,接头部分包含7个PEG单元。



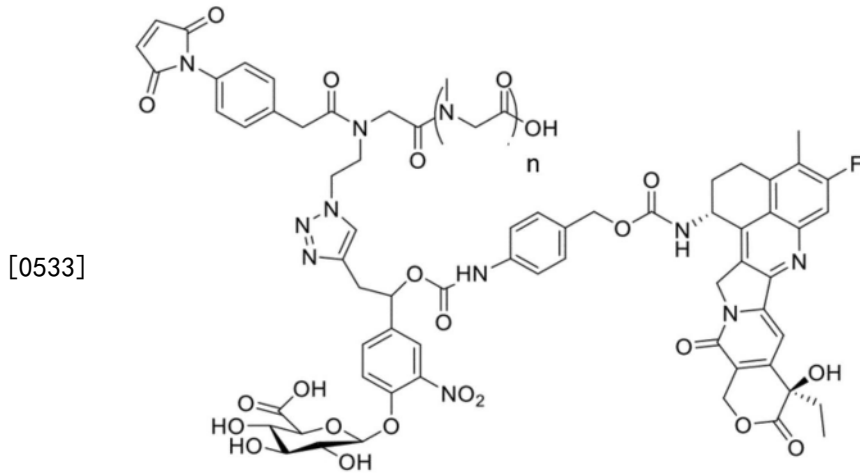
化合物 15b

[0530] 根据该实施例,包含此类接头部分的免疫缀合物或抗体-药物缀合物可具有以下化合物15b bis的结构。



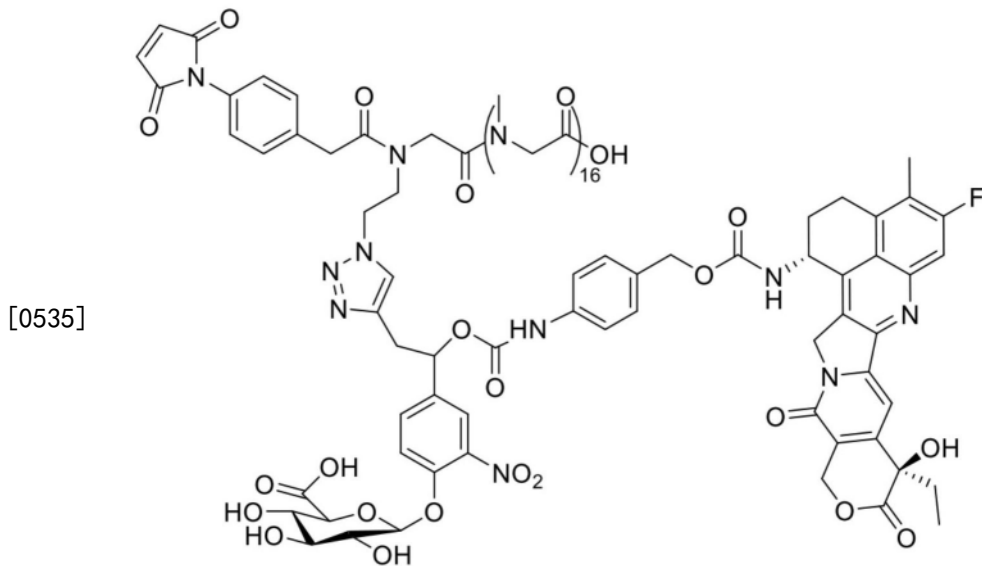
化合物 15b bis

[0532] 在一个实施方案中,接头部分(X-Z)是或包含根据下式XIV的结构,其中(Y)是间隔子,该间隔子(例如,在其末端)包含反应性基团(R)与氨基酸残基,例如抗体上的游离氨基、羟基、巯基或羧基反应的残基(例如,一个或多个赖氨酸残基的 ϵ 氨基,一个或多个谷氨酸或天冬氨酸残基的游离羧基,或一个或多个半胱氨酰残基的S原子),或例如糖基化氨基酸残基的聚糖结构(例如与抗体的Kabat残基N297结合的天然、截短或以其它方式修饰的N-聚糖)。在下式中,PSAR单元的数量n可以是例如1-72、1-24、1-16、1-10、1-12、1-8、1-6、8、16、18或24。



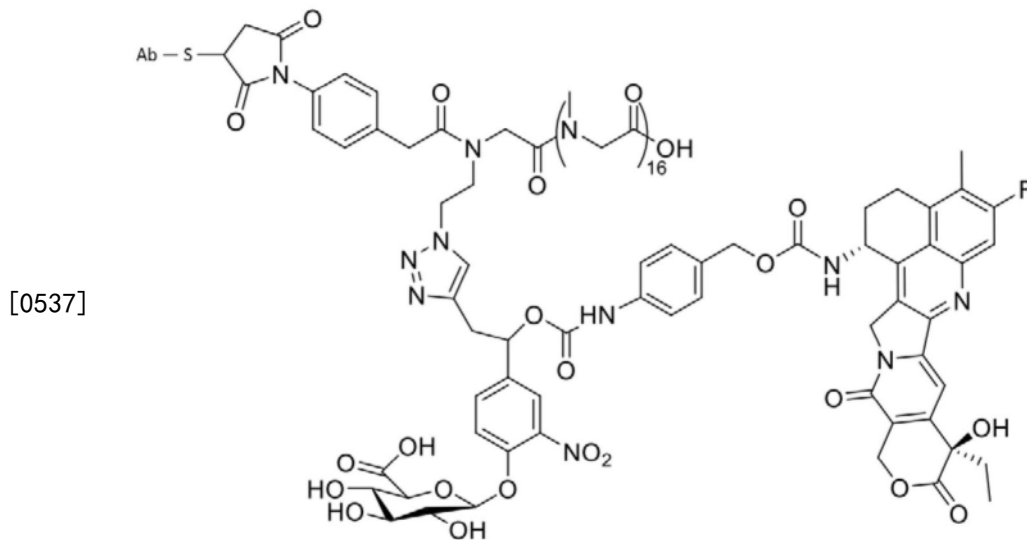
式 XIV

[0534] 具有马来酰亚胺作为R基团的示例性接头可具有以下化合物16的结构。在用还原剂还原链间二硫键后,此类接头可以通过抗体中的半胱氨酸残基与抗体缀合。



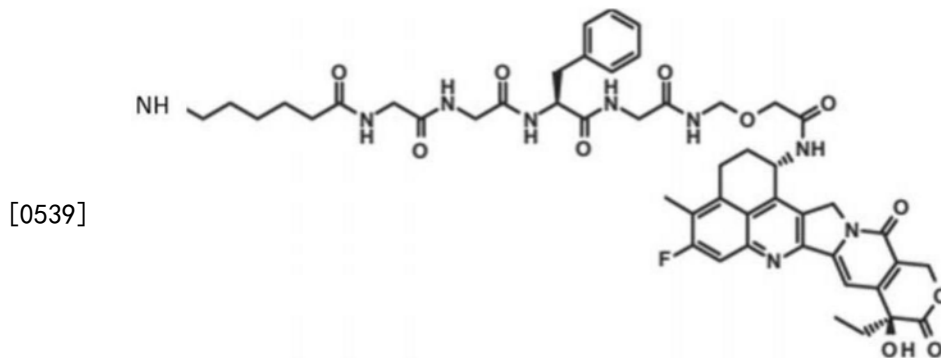
化合物 16

[0536] 根据该实施例,包含此类接头部分的免疫缀合物或抗体-药物缀合物可具有以下化合物16bis的结构。



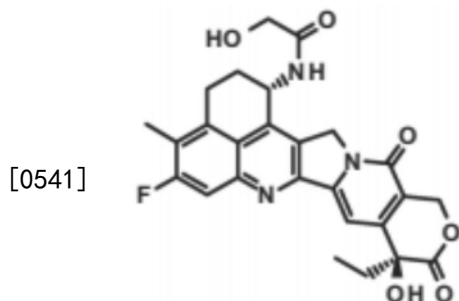
化合物 16 bis

[0538] 在另一个实施方案中,接头可以具有伯胺作为R基团,并且当在存在转谷氨酰胺酶的情况下与抗体反应时,可以产生包括用接头官能化的一个或多个受体谷氨酰胺残基的抗体。例如,接头(X-Z)或用该接头官能化的抗体具有或包含如以下化合物12所示的结构:



化合物 12。

[0540] 用式XI或化合物11和12的含寡肽接头官能化的抗Nectin-4结合蛋白导致释放(例如,在细胞内,在Nectin-4表达性肿瘤细胞的存在下)经取代的依喜替康,其具有存在于位置1的胺处的OH-CH₂-C(=O)取代基,如下文的结构中所示:



化合物 13 (Dxd)。

[0542] 当制备为具有伯胺的结构时,式III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII或XIV的示例性接头可以在存在转谷氨酰胺酶(例如细菌性转谷氨酰胺酶,BTG)的情况下与抗体反应,使得转谷氨酰胺酶催化接头与抗体初级结构内(例如在免疫球蛋白恒定结构域内或

在插入或附加到(例如融合到)恒定区的TGase识别标签内)的受体谷氨酰胺残基的缀合。用BTG介导的与抗体缀合的方法和接头描述于PCT公开号W02014/202773中,其公开内容以引用方式并入。BTG催化的缀合允许精确控制组合物中的平均药物:抗体比率。术语“转谷氨酰胺酶”,可与“TGase”或“TG”互换使用,是指能够通过肽结合型谷氨酰胺的 γ -羧酰胺基团与赖氨酸或结构相关的伯胺(如氨基戊基,例如肽结合型赖氨酸)的 ϵ -氨基之间的酰基转移反应来交联蛋白质从而产生 ϵ -(γ -谷氨酰)赖氨酸异肽键的酶。TGase尤其包含细菌性转谷氨酰胺酶(BTG),如具有EC参考EC 2.3.2.13的酶(蛋白质-谷氨酰胺- γ -谷氨酰转移酶)。术语“受体谷氨酰胺”残基,当提及抗体的谷氨酰胺残基时,是指被TGase识别并且可以通过谷氨酰胺和赖氨酸或结构相关的伯胺(诸如氨基戊基)之间的反应被TGase交联的谷氨酰胺残基。优选地,受体谷氨酰胺残基是表面暴露的谷氨酰胺残基。术语“TGase识别标签”是指包括受体谷氨酰胺残基的氨基酸序列,并且当在合适的条件下掺入(例如附加到)多肽序列中时,所述氨基酸序列被TGase识别并通过氨基酸序列内的氨基酸侧链和反应伙伴之间的反应导致TGase交联。识别标签可以是不天然存在于包括酶识别标签的多肽中的肽序列。TGase识别标签的示例包括W02012/059882和W02014/072482中公开的氨基酸序列。

[0543] 如W02013/092983和W02020/188061(其公开内容通过引用并入本文)中所举例说明的,接头-药物部分(X-Z)可以在两步过程中与抗体中的谷氨酰胺残基(受体谷氨酰胺)缀合,该两步过程包括:第一步骤,其中包含伯胺和第一反应性基团(R)的部分在BTG的存在下与抗体缀合;以及随后的使抗体-接头缀合物与包含以下各项的分子反应的步骤:(i)与第一反应性基团具反应性的第二反应性基团(R');以及(ii)细胞毒性剂(Z)。反应性基团对R和R'的示例包含一系列基团,这些基团能够进行双正交反应,例如叠氮化物和环辛炔之间的1,3-偶极环加成(无铜点击化学)、硝酮和环辛炔之间的1,3-偶极环加成、由醛和酮形成肟/腙以及四嗪连接(另见W02013/092983)。所得接头和官能化抗体或其Y元件因此可以包括由R和R'反应产生的RR'基团,例如三唑。

[0544] 抗Nectin-4免疫缀合物可以以1mg/ml到500mg/ml的浓度掺入药物调配物中,其中所述调配物的pH为2.0到10.0。调配物可以进一步包括缓冲系统、一种或多种防腐剂、一种或多种张力剂、一种或多种螯合剂、稳定剂和表面活性剂。在一个实施方案中,药物调配物是含水调配物,即包括水的调配物。此类调配物通常是溶液或悬浮液。在另一个实施方案中,药物调配物是水溶液。术语“含水调配物”定义为包括至少50%w/w水的调配物。同样,术语“水溶液”定义为包括至少50%w/w水的溶液,并且术语“水性悬浮液”定义为包括至少50%w/w水的悬浮液。

[0545] 在另一个实施方案中,药物调配物是冻干调配物,医师或患者在使用之前加入溶剂和/或稀释剂。

[0546] 在另一个实施方案中,药物调配物是干燥调配物(例如,冷冻干燥或喷雾干燥),无需任何预先溶解即可使用。

[0547] 在另一个方面,药物调配物包含此类抗体的水溶液和缓冲液,其中抗体以1mg/ml或更高的浓度存在,并且其中所述调配物的pH为约2.0到约10.0。

[0548] 在另一个实施方案中,调配物的pH处于选自以下组成的列表的范围内:约2.0到约10.0、约3.0到约9.0、约4.0到约8.5、约5.0到约8.0和约5.5到约7.5。

[0549] 在另一个实施方案中,缓冲液选自以下组成的组:乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、甘

氨酰甘氨酸、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三(羟甲基)-氨基甲烷、二羟乙甘氨酸、三甲基甘氨酸、苹果酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸或它们的混合物。这些特定缓冲液中的每一种构成本发明的替代性实施方案。

[0550] 在另一个实施方案中,调配物进一步包括药学上可接受的防腐剂。在另一个实施方案中,调配物进一步包括等渗剂。在另一个实施方案中,调配物还包括螯合剂。在本发明的另一个实施方案中,调配物进一步包括稳定剂。在另一个实施方案中,调配物进一步包括表面活性剂。为了方便起见,参考《雷明顿:药学科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》,第19版,1995。

[0551] 本发明的药物调配物中可能存在其它成分。此类额外的成分可包括润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张力调节剂、螯合剂、金属离子、油质媒剂、蛋白质(例如,人血清白蛋白、明胶或蛋白质)和两性离子(例如,氨基酸,诸如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。当然,此类额外的成分不应对本发明的药物调配物的总体稳定性产生不利影响。

[0552] 根据本发明的药物组合物的施用可以通过几种施用途径,例如静脉内施用。也可以通过检查其它已经开发的治疗性ADC的经验确定合适的抗体调配物。

[0553] 在任何实施方案中,组合物可以被表征为包括多个本公开的Nectin-4结合性免疫缀合物,其中样品中至少70%、80%、90%、95%、98%或99%的免疫缀合物具有每个抗体至少4个、6个或8个氨基酸残基,所述氨基酸残基用本文公开的接头官能化。在任何实施方案中,组合物可被表征为包括多个本公开的Nectin-4结合性免疫缀合物,其中样品中至少70%、80%、90%、95%、98%或99%的免疫缀合物具有每个抗体至少2个、4个、6个或8个氨基酸残基,所述氨基酸残基用接头-喜树碱部分,例如本文化学式的(X-Z)单元或(-Y)-(Pep)-(Y')-(Z)单元官能化。在任何实施方案中,组合物可以被表征为包括多个本公开的Nectin-4结合性免疫缀合物,其中样品中至少70%、80%、90%、95%、98%或99%的免疫缀合物具有每个抗体相同数量的官能化氨基酸,任选地其中所述数量为4、6或8。

[0554] 恶性肿瘤的诊断、预后和治疗

[0555] 在一些方面,描述了可用于诊断、预后、监测和治疗以在表面处表达Nectin-4的肿瘤细胞为特征的癌症的方法以及抗体、抗体片段和免疫缀合物。在治疗方法中,该治疗包括向人类受试者或个体施用本公开的抗体。在一些实施方案中,提供了用于改善向Nectin-4阳性肿瘤递送细胞毒性剂(特别是喜树碱类似物)的改善方法。细胞毒性剂的改善的递送可能是Nectin-4表达性肿瘤细胞的簇形成和/或非锚定依赖性生长的抗体介导的抑制的结果,导致细胞毒性剂和/或包含此类剂的ADC的肿瘤穿透改善。用本公开的ADC的治疗对于治疗具有较低或异质Nectin-4表达的疾病、对于患有特别抗性疾病或其它ADC不适合的患者、和/或对于与作为单一剂介导毒性的额外的治疗剂(例如,化疗剂)组合使用是特别有利的。

[0556] 在一个实施方案中,抗Nectin-4抗体或抗体片段可用于使肿瘤对细胞毒性剂或化疗剂敏化。与抗癌剂本身相比,通过降低癌细胞的化学抗性,抗Nectin-4抗体可用于加强或增强抗癌剂对癌症的毒性。包含抗Nectin-4抗体或抗体片段的癌症敏化组合物可用于使肿瘤(例如,Pgp表达性肿瘤)对抗癌剂敏化,以降低化学抗性并改善抗癌剂的治疗效果。

[0557] 在一个实施方案中,本公开的抗Nectin-4抗体或抗体片段可被指定为与化疗剂组合用于治疗人类个体中的肿瘤,其中抗Nectin-4抗体、抗体片段和化疗剂被调配用于分开

施用并且同时或相继施用。例如,治疗可包括向个体施用有效量的以下各项中的每一种:
(a) 本公开的抗Nectin-4抗体或抗体片段,和(b) 抗癌剂,任选地化疗剂,任选地已知能够被P-糖蛋白(Pgp)转运的化疗剂,任选地蒽环,长春花生物碱,依托泊苷,紫杉烷,铂化合物或任选地喜树碱。

[0558] 在一个实施方案中,抗体或抗体片段与细胞毒性剂,例如喜树碱、依喜替康或SN-38分子缀合。抗体或抗体片段通常与细胞毒性剂(例如喜树碱类似物、依喜替康)的多个分子缀合。细胞毒性剂(例如喜树碱或依喜替康)可通过包含蛋白酶可切割的寡肽接头在内的接头(例如,式VII-XIV中任一者的接头-毒素)与抗体缀合。示例性药物组合物可包含平均每个抗体分子1至8个细胞毒性剂分子(例如,喜树碱衍生物、依喜替康、式VII-XIV中任一者的接头-毒素),任选地每个抗体分子2-8个、4-8个、6-8个细胞毒性剂分子,或例如每个抗体分子约2个、4个、5个、6个、7个或8个细胞毒性剂分子。当抗体或抗体片段与依喜替康缀合(即,通过接头,例如式VII-XIV中任一者的接头-毒素)时,此类免疫缀合物特别有利于治疗PgP表达性肿瘤(例如,以表达PgP(MDR1)为特征的肿瘤)。以表达PgP为特征的肿瘤包括用化疗剂和ADC治疗后的肿瘤,例如,已经显示用包含澳瑞他汀(MMAE)有效载荷的ADC治疗诱导肿瘤上的PgP表达。另外,已知一系列以天然PgP/MDR1表达为特征的肿瘤,例如以下癌症表达显著水平的MDR1:肾癌、肾上腺皮质癌、胆管癌、肝癌、直肠癌、结肠癌、脑癌、胰腺癌、前列腺癌、间皮瘤、胃癌、AML、甲状腺癌、DLBC、食道癌、乳腺癌、肉瘤、睾丸癌、子宫癌、胸腺瘤、宫颈癌、肺癌、膀胱癌(例如,尿路上皮癌)以及头颈部鳞状细胞癌。

[0559] 与细胞毒性剂缀合的Nectin-4结合剂(例如,抗Nectin-4抗体或抗体片段)可以有利地用于治疗患有Nectin-4表达性癌症的个体,该Nectin-4表达性癌症以表达Nectin-4(例如,在肿瘤细胞膜或细胞表面处)的肿瘤细胞为特征。此类癌症的示例是尿路上皮癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌;HER2阳性乳腺癌)、非小细胞肺癌、胰腺癌、卵巢癌、胃癌、结肠直肠癌(例如结肠癌)、头颈部鳞状细胞癌和食道癌。

[0560] 与细胞毒性剂缀合的Nectin-4结合剂可用于Nectin-4高表达性肿瘤。

[0561] 与细胞毒性剂缀合的Nectin-4结合剂也可用于异质和/或低Nectin-4表达性肿瘤。在此类肿瘤中,本公开的免疫缀合物可以提供有利的功效,任选地通过避免MDR1介导的抗性和/或旁观者抗肿瘤作用。

[0562] 与细胞毒性剂缀合的Nectin-4结合剂可有利地用于治疗个体,无论Nectin-4表达水平如何,无论个体内肿瘤细胞上的Nectin-4表达水平的异质性如何,和/或无论该个体先前是否已经用维汀-恩弗妥单抗治疗过。当细胞毒性剂是依喜替康时,与细胞毒性剂缀合的Nectin-4结合剂也可有利地用于治疗个体,无论肿瘤PgP表达如何和/或无论个体先前是否已经用包含能够被PgP转运的细胞毒性剂的ADC治疗过(例如,包含与除依喜替康之外的喜树碱类似物缀合的抗Nectin-4抗体的ADC、包含与Dxd缀合(例如,通过含GGFG接头)的抗Nectin-4抗体或包含与澳瑞他汀、蒽环、长春花生物碱、依托泊苷、紫杉烷或铂化合物缀合的抗Nectin-4抗体的ADC)。

[0563] 在一个实施方案中,与喜树碱衍生物分子缀合的Nectin-4结合剂可有利地用于治疗先前已经用维汀-恩弗妥单抗治疗过的个体。在维汀-恩弗妥单抗治疗后,此类个体可以任选地患有以异质和/或低Nectin4表达性肿瘤为特征的癌症。在维汀-恩弗妥单抗治疗后,此类个体可任选地患有以PgP表达性肿瘤为特征的癌症。个体可能患有尽管用与澳瑞他汀

或MMAE分子缀合的抗体(例如,维汀-恩弗妥单抗)治疗但仍(例如在期间或之后)具有抗性、无应答、复发和/或进展的癌症。例如,个体可能患有局部晚期或转移性尿路上皮癌,并且先前接受过用与澳瑞他汀或MMAE分子缀合的抗体(例如,维汀-恩弗妥单抗)进行的治疗。

[0564] 在一个实施方案中,包含通过接头与依喜替康缀合的Nectin-4结合剂的免疫缀合物有利地用于治疗先前已经用免疫缀合物治疗的个体,该免疫缀合物包含通过接头与能够被Pgp转运的细胞毒性剂缀合的Nectin-4结合剂。在一个实施方案中,包含通过接头与依喜替康缀合的Nectin-4结合剂的免疫缀合物有利地用于在免疫缀合物治疗之后,治疗患有以异质和/或低Nectin4表达性肿瘤为特征的癌症的个体,该免疫缀合物包含通过接头与能够被Pgp转运的细胞毒性剂缀合的Nectin-4结合剂。在一个实施方案中,包含通过接头与依喜替康缀合的Nectin-4结合剂的免疫缀合物有利地用于治疗患有癌症的个体,该癌症尽管用Nectin-4结合剂治疗过但仍(例如在期间或之后)具有抗性、无应答、复发和/或进展,该Nectin-4结合剂通过接头与能够被Pgp转运的细胞毒性剂缀合。任选地,通过接头与能够被Pgp转运的细胞毒性剂缀合的Nectin-4结合剂包含通过接头与喜树碱类似物缀合的抗Nectin-4抗体,以便在接头切割时释放除依喜替康外的喜树碱类似物(例如,Dxd或德卢替康)。任选地,通过接头与能够被Pgp转运的细胞毒性剂缀合的Nectin-4结合剂包含与Dxd缀合(例如,通过含GGFG接头)的抗Nectin-4抗体。任选地,通过接头与能够被Pgp转运的细胞毒性剂缀合的Nectin-4结合剂包含与澳瑞他汀、蒽环、长春花生物碱、依托泊苷、紫杉烷或铂化合物缀合的抗Nectin-4抗体。任选地,通过接头与能够被Pgp转运的细胞毒性剂缀合的Nectin-4结合剂包含结合Nectin-4的IgV结构域的抗Nectin-4抗体。任选地,通过接头与能够被Pgp转运的细胞毒性剂缀合的Nectin-4结合剂包含结合Nectin-4的VC1桥接结构域的抗Nectin-4抗体。在一个实施方案中,包含通过接头与依喜替康缀合的Nectin-4结合剂的免疫缀合物包含具有可酶促切割部分(和任选地自消解间隔子)的接头,其导致在切割时释放依喜替康。

[0565] 在晚期复发性或转移性尿路上皮癌中,很大一部分个体会在肿瘤细胞上表达高水平的Nectin-4,例如H评分至少为290(参见EV-201临床试验队列1Nectin-4表达)。然而,一部分患者的H评分小于250,并且有些小于200。少数患者的H评分小于150,有些患者的H评分小于100。在三阴性乳腺癌(TNBC)中,据报道62%的患者在肿瘤细胞上具有高Nectin-4表达,并且38%在肿瘤细胞上具有低Nectin-4表达(Rabat等人,2017《肿瘤学年鉴(Annals Onc.)》28:769-776)。在其它癌症类型中,Nectin-4表达的中值H评分值通常低于在UC中观察到的值,特别是在非小细胞肺癌、胰腺癌、卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌和食道癌中观察到的。

[0566] 在一个实施方案中,根据本公开治疗的个体患有晚期复发性或转移性癌症,任选地患有晚期复发性或转移性尿路上皮癌。

[0567] 在一个实施方案中,根据本公开治疗的个体患有癌症(例如,乳腺癌),该癌症对雌激素受体和/或孕酮受体测试呈阳性,而对表皮生长因子受体2(HER2)或过量HER2蛋白测试呈阴性,任选地该癌症对HER2测试呈阳性但HER2以低水平表达。

[0568] 在一个实施方案中,根据本公开治疗的个体患有三阴性乳腺癌(TNBC),例如对雌激素受体、孕酮受体和过量HER2蛋白测试呈阴性的乳腺癌。

[0569] 在一个实施方案中,根据本公开治疗的个体患有对HER2蛋白测试呈阳性的癌症

(例如,乳腺癌),任选地其中该癌症表达过量的HER2蛋白(HER2过表达),任选地该癌症表达低水平的HER2蛋白(低于过量HER2表达)。在一个实施方案中,个体用抗Nectin-4 ADC与结合HER2多肽的剂(例如,抗体)(例如,曲妥珠单抗、帕妥珠单抗)组合治疗;任选地,其中结合HER2的剂是ADC;任选地,其中结合HER2的抗体与细胞毒性剂,任选地澳瑞他汀、美登木素(例如,DM1)或喜树碱类似物(例如,化合物1、2或13)缀合;任选地,其中结合HER2的抗体是恩美曲妥珠单抗(trastuzumab emtansine)或德卢替康-曲妥珠单抗(trastuzumab deruxtecan,DS-8201a;Enhertu™)。

[0570] 在一个实施方案中,根据本公开治疗的个体患有非小细胞肺癌,任选地患有肺腺癌。

[0571] 在一个实施方案中,根据本公开治疗的个体患有胰腺癌。

[0572] 在一个实施方案中,根据本公开治疗的个体患有卵巢癌。

[0573] 在一个实施方案中,根据本公开治疗的个体患有头颈部鳞状细胞癌。

[0574] 在一个实施方案中,根据本公开治疗的个体患有食道癌。

[0575] 在一个实施方案中,根据本公开治疗的个体患有结肠直肠癌。如本文所使用的,结肠直肠癌(CRC)是指结肠癌、直肠癌和结肠直肠癌(结肠区域和直肠区域两者的癌症)。

[0576] 在一个实施方案中,根据本公开治疗的个体患有对HER2蛋白测试呈阳性的NSCLC或肺腺癌、胃癌、结肠直肠癌、胰腺癌、尿路上皮癌或膀胱癌,任选地其中所述癌症表达过量的HER2蛋白(HER2过表达),任选地所述癌症表达低水平的HER2蛋白(低于过量HER2表达)。在一个实施方案中,个体用根据本公开的抗Nectin-4 ADC与结合HER2多肽的剂(例如,抗体)(例如,包含曲妥珠单抗或帕妥珠单抗的重链和轻链CDR或可变区的抗体)组合治疗。任选地,其中结合HER2的剂是ADC;任选地,其中结合HER2的抗体与细胞毒性剂,任选地澳瑞他汀、美登木素(例如,DM1)或喜树碱类似物(例如,化合物1、2或13)缀合;任选地,其中结合Her2的抗体是恩美曲妥珠单抗或德卢替康-曲妥珠单抗(DS-8201a)。

[0577] 如本文所示,在切割时(例如,在包含细胞毒性剂Z的细胞内可切割的接头的切割时)释放依喜替康的ADC在治疗对具有接头的ADC具有抗性的肿瘤中特别有利,这些接头在切割时释放被Pgp转运的细胞毒性剂(除依喜替康之外),例如澳瑞他汀或Dxd。因此,在一个实施方案中,当用抗Nectin-4结合剂(例如,抗Nectin-4 ADC)和抗HER2 ADC的组合治疗HER2阳性癌症时,抗HER2 ADC可被设计成在切割时(例如,在包含细胞毒性剂Z的细胞内可切割的接头的切割时)释放依喜替康。抗Nectin-4结合剂(例如,抗Nectin-4 ADC)可被设计成在切割时(例如,在包含细胞毒性剂Z的细胞内可切割的接头的切割时)释放依喜替康,或可释放任何其它细胞毒性剂(Z),例如其中Z是紫杉烷、葱环、喜树碱、埃博霉素、丝裂霉素、康普瑞汀、长春花生物碱、氮芥、美登木素、倍癌霉素、微管溶素、尾海兔素、澳瑞他汀、烯二炔、吡咯并苯二氮卓、鹅膏毒素或乙烯亚胺。

[0578] 因此,在一个方面,本公开提供了结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物,该免疫缀合物用于治疗癌症(例如,HER2阳性Nectin-4阳性癌症),其中结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物由下式表示:

[0579] $Ab_{N4} - (X_{N4} - (Z_{N4}))$

[0580] 其中,

[0581] Ab_{N4} 是特异性结合人Nectin-4多肽的多肽、肽或抗体;

[0582] X_{N4} 是连接 Ab_{N4} 和 Z_{N4} 的分子,其中 X_{N4} 例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下包含可切割部分,任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽;以及

[0583] Z_{N4} 包含细胞毒性剂;

[0584] 其中结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物与由下式表示的结合人HER2多肽的免疫缀合物组合使用:

[0585] $Ab_{HER2} - (X_{HER2} - (Z_{HER2}))$

[0586] 其中,

[0587] Ab_{HER2} 是特异性结合人HER2多肽的多肽、肽或抗体,任选地其中 Ab_{HER2} 包含曲妥珠单抗或帕妥珠单抗的重链和轻链CDR或可变区;

[0588] X_{HER2} 是连接 Ab_{HER2} 和 Z_{HER2} 的分子,其中 X_{HER2} 例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下包含可切割部分,任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽;以及

[0589] Z_{HER2} 是依喜替康。结合人HER2多肽的免疫缀合物在可切割部分的切割时释放依喜替康。任选地, Z_{N4} 是依喜替康,任选地,结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物在可切割部分的切割时释放依喜替康。

[0590] 此外,在一个方面,本公开提供了结合人HER2多肽的免疫缀合物,该免疫缀合物用于治疗癌症(例如,HER2阳性Nectin-4阳性癌症),其中结合人HER2多肽的免疫缀合物由下式表示:

[0591] $Ab_{HER2} - (X_{HER2} - (Z_{HER2}))$

[0592] 其中,

[0593] Ab_{HER2} 是特异性结合人HER2多肽的多肽、肽或抗体,任选地其中 Ab_{HER2} 包含曲妥珠单抗或帕妥珠单抗的重链和轻链CDR或可变区;

[0594] X_{HER2} 是连接 Ab_{HER2} 和 Z_{HER2} 的分子,其中 X_{HER2} 例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下包含可切割部分,任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽;以及

[0595] Z_{HER2} 是依喜替康;

[0596] 其中结合人HER2多肽的免疫缀合物与由下式表示的结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物组合使用:

[0597] $Ab_{N4} - (X_{N4} - (Z_{N4}))$

[0598] 其中,

[0599] Ab_{N4} 是特异性结合人Nectin-4多肽的多肽、肽或抗体;

[0600] X_{N4} 是连接 Ab_{N4} 和 Z_{N4} 的分子,其中 X_{N4} 例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下包含可切割部分,任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽;以及

[0601] Z_{N4} 包含细胞毒性剂。结合人HER2多肽的免疫缀合物在可切割部分的切割时释放依喜替康。任选地, Z_{N4} 是依喜替康,任选地,结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物在可切割部分的切割时释放依喜替康。

[0602] 因此,在一个方面,本公开提供了结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物,该免疫缀合物用于治疗癌症(例如,TROP-2阳性Nectin-4阳性癌症),其中结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物由下式表示:

[0603] $Ab_{N4} - (X_{N4} - (Z_{N4}))$

[0604] 其中,

[0605] Ab_{N4} 是特异性结合人Nectin-4多肽的多肽、肽或抗体；

[0606] X_{N4} 是连接 Ab_{N4} 和 Z_{N4} 的分子，其中 X_{N4} 例如在生理条件下，任选地在细胞内条件下包含可切割部分，任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽；并且

[0607] Z_{N4} 包含细胞毒性剂；

[0608] 其中结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物与由下式表示的结合人TROP-2多肽的免疫缀合物组合使用：

[0609] $Ab_{TROP-2} - (X_{TROP-2} - (Z_{TROP-2}))$

[0610] 其中，

[0611] Ab_{TROP-2} 是特异性结合人TROP-2多肽的多肽、肽或抗体，任选地其中 Ab_{TROP-2} 包含德达博妥单抗 (datopotamab) 或戈沙妥珠单抗 (sacituzumab) 的重链和轻链CDR或可变区；

[0612] X_{TROP-2} 是连接 Ab_{TROP-2} 和 Z_{TROP-2} 的分子，其中 X_{TROP-2} 例如在生理条件下，任选地在细胞内条件下包含可切割部分，任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽；并且

[0613] Z_{TROP-2} 是依喜替康。结合人TROP-2多肽的免疫缀合物在可切割部分的切割时释放依喜替康。任选地， Z_{N4} 是依喜替康，任选地，结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物在可切割部分的切割时释放依喜替康。

[0614] 此外，在一个方面，本公开提供了结合人TROP-2多肽的免疫缀合物，该免疫缀合物用于治疗癌症（例如，TROP-2阳性Nectin-4阳性癌症），其中结合人TROP-2多肽的免疫缀合物由下式表示：

[0615] $Ab_{TROP-2} - (X_{TROP-2} - (Z_{TROP-2}))$

[0616] 其中，

[0617] Ab_{TROP-2} 是特异性结合人TROP-2多肽的多肽、肽或抗体，任选地其中 Ab_{TROP-2} 包含德达博妥单抗 (datopotamab) 或戈沙妥珠单抗 (sacituzumab) 的重链和轻链CDR或可变区；

[0618] X_{TROP-2} 是连接 Ab_{TROP-2} 和 Z_{TROP-2} 的分子，其中 X_{TROP-2} 例如在生理条件下，任选地在细胞内条件下包含可切割部分，任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽；并且

[0619] Z_{TROP-2} 是依喜替康；

[0620] 其中结合人TROP-2多肽的免疫缀合物与由下式表示的结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物组合使用：

[0621] $Ab_{N4} - (X_{N4} - (Z_{N4}))$

[0622] 其中，

[0623] Ab_{N4} 是特异性结合人Nectin-4多肽的多肽、肽或抗体；

[0624] X_{N4} 是连接 Ab_{N4} 和 Z_{N4} 的分子，其中 X_{N4} 例如在生理条件下，任选地在细胞内条件下包含可切割部分，任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽；并且

[0625] Z_{N4} 包含细胞毒性剂。结合人TROP-2多肽的免疫缀合物在可切割部分的切割时释放依喜替康。任选地， Z_{N4} 是依喜替康，任选地，结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物在可切割部分的切割时释放依喜替康。

[0626] 因此，在一个方面，本公开提供了结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物，该免疫缀合物用于治疗癌症（例如，B7H3阳性Nectin-4阳性癌症），其中结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物由下式表示：

[0627] $Ab_{N4} - (X_{N4} - (Z_{N4}))$

[0628] 其中,

[0629] Ab_{N4} 是特异性结合人Nectin-4多肽的多肽、肽或抗体;

[0630] X_{N4} 是连接 Ab_{N4} 和 Z_{N4} 的分子,其中 X_{N4} 例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下包含可切割部分,任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽;并且

[0631] Z_{N4} 包含细胞毒性剂;

[0632] 其中结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物与由下式表示的结合人B7H3多肽的免疫缀合物组合使用:

[0633] $Ab_{B7H3} - (X_{B7H3} - (Z_{B7H3}))$

[0634] 其中,

[0635] Ab_{B7H3} 是特异性结合人B7H3多肽的多肽、肽或抗体,任选地其中 Ab_{B7H3} 包含依布妥珠单抗(enoblituzumab)、ifinatamab、米佐妥单抗(mirzotamab)、obrindatamab、艾沃利单抗(omburtamab)或vobramitamab的重链和轻链CDR或可变区;

[0636] X_{B7H3} 是连接 Ab_{B7H3} 和 Z_{B7H3} 的分子,其中 X_{B7H3} 例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下包含可切割部分,任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽;并且

[0637] Z_{B7H3} 是依喜替康。结合人B7H3多肽的免疫缀合物在可切割部分的切割时释放依喜替康。任选地, Z_{N4} 是依喜替康,任选地,结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物在可切割部分的切割时释放依喜替康。

[0638] 此外,在一个方面,本公开提供了结合人B7H3多肽的免疫缀合物,该免疫缀合物用于治疗癌症(例如,B7H3阳性Nectin-4阳性癌症),其中结合人B7H3多肽的免疫缀合物由下式表示:

[0639] $Ab_{B7H3} - (X_{B7H3} - (Z_{B7H3}))$

[0640] 其中,

[0641] Ab_{B7H3} 是特异性结合人B7H3多肽的多肽、肽或抗体,任选地其中 Ab_{B7H3} 包含依布妥珠单抗(enoblituzumab)、ifinatamab、米佐妥单抗(mirzotamab)、obrindatamab、艾沃利单抗(omburtamab)或vobramitamab的重链和轻链CDR或可变区;

[0642] X_{B7H3} 是连接 Ab_{B7H3} 和 Z_{B7H3} 的分子,其中 X_{B7H3} 例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下包含可切割部分,任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽;并且

[0643] Z_{B7H3} 是依喜替康;

[0644] 其中结合人B7H3多肽的免疫缀合物与由下式表示的结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物组合使用:

[0645] $Ab_{N4} - (X_{N4} - (Z_{N4}))$

[0646] 其中,

[0647] Ab_{N4} 是特异性结合人Nectin-4多肽的多肽、肽或抗体;

[0648] X_{N4} 是连接 Ab_{N4} 和 Z_{N4} 的分子,其中 X_{N4} 例如在生理条件下,任选地在细胞内条件下包含可切割部分,任选地是蛋白酶可切割的二肽、三肽、四肽或五肽;以及

[0649] Z_{N4} 包含细胞毒性剂。结合人B7H3多肽的免疫缀合物在可切割部分的切割时释放依喜替康。任选地, Z_{N4} 是依喜替康,任选地,结合人Nectin-4多肽的免疫缀合物在可切割部分的切割时释放依喜替康。

[0650] 在一方面,本公开的治疗方法不依赖于对肿瘤组织中Nectin-4表达的评估或检测

和/或不依赖于肿瘤细胞上Nectin-4的表达水平和/或来自所述个体的组织样品中Nectin-4表达性肿瘤细胞的频率或数量。在一个方面,本公开的治疗方法不依赖于评估或检测肿瘤PgP(MDR1)表达。

[0651] 在一个方面,本发明提供了在对其有需要的个体中治疗癌症和/或引发抗肿瘤免疫应答的方法,其中所述个体患有晚期复发性或转移性尿路上皮癌或乳腺癌(例如TNBC),其中所述方法不需要预先确定该个体是否具有包含表达Nectin-4的细胞(例如肿瘤细胞)的肿瘤组织。

[0652] 在一个方面,本发明提供了在对其有需要的个体中治疗癌症和/或杀死肿瘤细胞的方法,其中所述个体患有晚期复发性或转移性尿路上皮癌或乳腺癌(例如TNBC),其中所述方法不需要预先确定该个体是否具有包含表达高水平Nectin-4的细胞(例如肿瘤细胞)的肿瘤组织,如通过免疫组织化学评估(例如H评分或其它适当的IHC评分方法)所定义的。

[0653] 在一方面,在个体中治疗癌症和/或杀死肿瘤细胞的方法不需要预先确定肿瘤细胞的Nectin-4表达水平。

[0654] 在一方面,在个体中治疗癌症,任选地晚期复发性或转移性尿路上皮癌或乳腺癌(例如TNBC、HER2阳性癌症)的方法包括治疗患有特征在于Nectin-4表达的H评分不大于或小于290、250、200、150或100的癌症的个体。

[0655] 在用于在个体中治疗或预防癌症的任何实施方案中,方法可被指定为包括以下步骤:(i) 鉴定其肿瘤细胞表达Nectin-4(例如,通过免疫组织化学确定)的个体;以及(ii) 向个体施用有效量的本公开的抗Nectin-4抗体药物缀合物。

[0656] 在用于在个体中治疗或预防癌症的任何实施方案中,方法可被指定为包括以下步骤:(i) 鉴定其肿瘤细胞表达(a) Nectin-4(例如通过免疫组织化学确定)和(b) HER2的个体,任选地其中肿瘤细胞表达低水平的HER2(例如,通过免疫组织化学确定;通过HerceptestTM确定);以及(ii) 向个体施用有效量的本公开的抗Nectin-4抗体药物缀合物,任选地与结合Her2多肽的剂(例如,抗体)(例如,曲妥珠单抗、帕妥珠单抗)组合;任选地,其中结合Her2的抗体是ADC;任选地,其中结合Her2的抗体与细胞毒性剂,任选地澳瑞他汀、美登木素(例如,DM1)或喜树碱衍生物(例如,化合物1、2或13)缀合。任选地,其中结合Her2的抗体是恩美曲妥珠单抗或德卢替康-曲妥珠单抗(DS-8201a)。

[0657] 在用于在个体中治疗或预防癌症的任何实施方案中,方法可被指定为包括以下步骤:(i) 鉴定其肿瘤细胞具有低或中等水平的Nectin-4表达(例如,通过免疫组织化学确定)的个体;以及(ii) 向步骤(i)中鉴定的个体施用有效量的本公开的抗Nectin-4抗体药物缀合物。

[0658] 在用于在个体中治疗或预防癌症(例如,Nectin-4阳性癌症)的任何实施方案中,方法可被指定为包括以下步骤:(i) 鉴定其癌症特征在于低水平Nectin-4表达(例如通过免疫组织化学确定)的个体;以及(ii) 向步骤(i)中鉴定的个体施用有效量的本公开的抗Nectin-4抗体药物缀合物。在一个实施方案中,个体患有特征在于Nectin-4表达的H评分不大于或小于150或100的癌症。

[0659] 在用于在个体中治疗或预防癌症(例如,Nectin-4阳性癌症)的任何实施方案中,方法可被指定为包括以下步骤:(i) 鉴定其癌症特征在于中等水平肿瘤Nectin-4表达(例如通过免疫组织化学确定)的个体;以及(ii) 向个体施用有效量的本公开的抗Nectin-4抗体

药物缀合物。在一个实施方案中,所述个体患有特征在于Nectin-4表达的H评分不大于或小于290、250、200、150的癌症,任选地进一步其中所述癌症的特征在于Nectin-4表达的H评分至少为100。

[0660] 在又一个实施方案中,提供了一种用于在个体中治疗或预防癌症(例如,Nectin-4阳性癌症)的方法,该方法包括:(i) 鉴定其癌症特征在于肿瘤Nectin-4表达的H评分不大于或小于290、250、200、150、120或100的个体;以及(ii) 向个体施用有效量的本公开的抗Nectin-4抗体药物缀合物。任选地,步骤(i) 可以被指定为包括通过组织化学(例如IHC) 评估肿瘤细胞上的Nectin-4表达的步骤。

[0661] 在又一个实施方案中,提供了一种用于在个体中治疗或预防癌症(例如,Nectin-4阳性癌症;乳腺癌)的方法,该方法包括:(i) 鉴定其癌症特征在于肿瘤Nectin-4表达的QS评分不大于或小于200、150、120或100的个体;以及(ii) 向个体施用有效量的本公开的抗Nectin-4抗体药物缀合物。任选地,步骤(i) 可以被指定为包括通过组织化学(例如IHC) 评估肿瘤细胞上的Nectin-4表达的步骤。

[0662] 可以获取和评估来自个体的生物样品,例如来自活检的生物样品。任选地,将样品保存为甲醛(例如福尔马林) 固定石蜡包埋(FFPE) 样品。脱蜡后,载玻片适用于检测Nectin-4 (和/或HER2、TROP-2、B7H3) 表达的方法。

[0663] Nectin-4、TROP-2、B7H3和/或HER2在肿瘤细胞中的表达可以通过本领域已知的任何方法来确定。在某些实施方案中,测定包含免疫组织化学(IHC) 测定、荧光活化细胞分选(FACS) 测定,例如定量FACS、ELISA、免疫印迹(例如蛋白质印迹、斑点印迹或细胞内蛋白质印迹) 和其它免疫测定。

[0664] 组织切片的IHC染色已被证明是评估或检测样品中蛋白质存在的可靠方法。免疫组织化学技术利用抗体原位探测和可视化细胞抗原,通常通过显色或荧光方法。因此,抗体或抗血清(在一些实施方案中,多克隆抗血清,以及在一些实施方案中,对每种标志物具有特异性的单克隆抗体) 用于检测表达。可以通过直接标记抗体本身来检测抗体,例如用放射性标记、荧光标记、半抗原标记(如生物素) 或酶(如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶) 进行标记。可替代地,将未标记的初级抗体与经标记的二级抗体联合使用,所述二级抗体包括抗血清、多克隆抗血清或对初级抗体具有特异性的单克隆抗体。免疫组织化学方案和试剂盒在本领域是众所周知的并且是可商购的。

[0665] 在一些实施方案中,IHC测定是直接测定,其中直接确定抗体与靶抗原的结合。这种直接测定使用经标记的试剂,如荧光标签或酶标记的初级抗体,其无需例另外的抗体相互作用即可观察到。在一些实施方案中,IHC测定是间接测定。在典型的间接测定中,未缀合的初级抗体与抗原结合,然后经标记的二级抗体与初级抗体结合。当二级抗体与酶标记结合时,添加显色或荧光底物以提供抗原的可视化。发生信号放大是因为几种二级抗体可能与初级抗体上的不同表位发生反应。用于免疫组织化学的初级抗体和/或二级抗体通常用可检测分子进行标记。有多种标签可供选择,包含放射性同位素、胶体金颗粒、荧光标签和酶底物标签。

[0666] 强染色、中等染色和弱染色是本领域技术人员熟知的描述。在一些方面,强染色、中等染色和弱染色是校准的染色水平,其中建立了一个范围并且将染色强度分级在该范围内。在一些实施方案中,强染色是在强度范围的第75个百分位以上的染色,中等染色是在强

度范围的第25到75个百分位的染色,而低染色是在强度范围的第25个百分位以下的染色。在一些方面,熟悉特定染色技术的本领域技术人员调整箱大小并定义染色类别。

[0667] (例如,当用抗Nectin-4抗体染色时)具有不同染色强度的对照细胞系(例如,离心成团块,福尔马林固定和石蜡包埋,例如,被制备成组织微阵列,并且例如用抗Nectin-4抗体染色)可用作IHC分析的对照。普通技术人员理解,具有阴性、弱、中等和高c-met染色强度的其它对照细胞团块可以使用本领域公知和本文公开的本申请的教导和方法容易地鉴定。

[0668] 在一些实施方案中,当癌症或肿瘤为(例如,使用IHC测定被确定为)Nectin-4阳性时,其被认为是Nectin-4表达性癌症肿瘤。

[0669] 在一些实施方案中,当样品中5%或更多的肿瘤细胞表达Nectin-4蛋白(例如,以任何强度表达Nectin-4蛋白)时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中10%或更多的肿瘤细胞表达Nectin-4蛋白(例如,以任何强度表达Nectin-4蛋白)时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中20%或更多的肿瘤细胞表达Nectin-4蛋白(例如,以任何强度表达Nectin-4蛋白)时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中30%或更多的肿瘤细胞表达Nectin-4蛋白(例如,以任何强度表达Nectin-4蛋白)时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中40%或更多的肿瘤细胞表达Nectin-4蛋白(例如,以任何强度表达Nectin-4蛋白)时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中50%或更多的肿瘤细胞表达Nectin-4蛋白(例如,以任何强度表达Nectin-4蛋白)时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中60%或更多的肿瘤细胞表达Nectin-4蛋白(例如,以任何强度表达Nectin-4蛋白)时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中70%或更多的肿瘤细胞表达Nectin-4蛋白(例如,以任何强度表达Nectin-4蛋白)时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中80%或更多的肿瘤细胞表达Nectin-4蛋白(例如,以任何强度表达Nectin-4蛋白)时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中90%或更多的肿瘤细胞表达Nectin-4蛋白(例如,以任何强度表达Nectin-4蛋白)时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。

[0670] 在一些实施方案中,当样品中5%或更多的肿瘤细胞以中等和/或强染色强度表达Nectin-4蛋白时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中10%或更多的肿瘤细胞以中等和/或强染色强度表达Nectin-4蛋白时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中20%或更多的肿瘤细胞以中等和/或强染色强度表达Nectin-4蛋白时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中30%或更多的肿瘤细胞以中等和/或强染色强度表达Nectin-4蛋白时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中40%或更多的肿瘤细胞以中等和/或强染色强度表达Nectin-4蛋白时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中50%或更多的肿瘤细胞以中等和/或强染色强度表达Nectin-4蛋白时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中60%或更多的肿瘤细胞以中等和/或强染色强度表达Nectin-4蛋白时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中70%或更多的肿瘤细胞以中等和/或强染色强度表达Nectin-4蛋白时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中80%或更多的肿瘤细胞以中等和/或强

染色强度表达Nectin-4蛋白时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。在一些实施方案中,当样品中90%或更多的肿瘤细胞以中等和/或强染色强度表达Nectin-4蛋白时,个体的癌症或肿瘤为Nectin-4阳性。

[0671] 评估免疫组织化学测定以确定个体的癌症或肿瘤是否以高Nectin-4表达(例如低或中等Nectin-4表达)为特征通常将涉及应用已知的评分方法。

[0672] 低、中等和高肿瘤Nectin-4表达可以基于美国专利公布第2013/0005678号中描述的“H评分”来确定。H评分是通过下式获得的： $(3 \times \text{强染色细胞百分比}) + (2 \times \text{中等染色细胞百分比}) + (\text{弱染色细胞百分比})$,得到0到300的范围。H评分特别用于UC中。

[0673] 在本文的任何方法的一些实施方案中,低或中等Nectin-4表达(例如,具有低或中等Nectin-4表达水平的肿瘤或肿瘤细胞)对应于约250或更低、约220或更低、约200或更低、约180或更低、约160或更低、约150或更低、约140或更低、约130或更低、约120或更低、约110或更低或约100或更低的H评分。

[0674] 在本文中的任何方法的一些实施方案中,低Nectin-4表达(例如,具有低Nectin-4表达水平的肿瘤或肿瘤细胞)对应于200或更低、约180或更低、约160或更低、约150或更低、约140或更低、约130或更低、约120或更低、约110或更低或约100或更低的H评分。

[0675] 在本文中的任何方法的一些实施方案中,高Nectin-4表达(例如,具有高Nectin-4表达水平的肿瘤或肿瘤细胞)对应于约290或更高的H评分。

[0676] 在另一个示例中,Nectin-4染色可以根据Quick score(QS)使用下式进行评分： $QS = P(\text{阳性细胞百分比}) \times I(\text{强度})$,最高评分为300。QS已例如用于乳腺癌中。例如,在TNBC中,一些研究小组已将Nectin-4低表达组定义为 $QS = \text{或} < 100$ 。在本文的任何方法的一些实施方案中,低或中等Nectin-4表达(例如,具有低或中等Nectin-4表达水平的肿瘤或肿瘤细胞)对应于约200或更低、约180或更低、约160或更低、约150或更低、约140或更低、约130或更低、约120或更低、约110或更低或约100或更低的QS评分。

[0677] 用于评估HER2的肿瘤细胞表达的测定是本领域熟知的。例如,如FDA批准的SPoT-Light HER2 CISH等测定法可用于检测HER2过表达。显色原位杂交(CISH)检测HER2基因扩增。该技术也被称为减影探针技术显色原位杂交,是用于观察乳腺癌细胞是否在细胞表面过表达HER2受体蛋白的测试。

[0678] 另一种广泛使用的HER2测定是HercepTest™(丹科北美有限公司(Dako North America, Inc.)),这是一种半定量免疫组织化学测定,用于在福尔马林固定、石蜡包埋的癌组织中确定HER2蛋白的过表达。例如,表达低水平HER2的肿瘤可通过HercepTest™以+1至+2的评分来鉴定。

[0679] 在一方面,所述治疗用于患有现有神经病、糖尿病或高血糖、心功能不全、眼部病变的个体。此类病症可以使个体不适合用具有比本公开的抗Nectin-4抗体药物缀合物更高的毒性或更窄的治疗窗口的抗Nectin-4 ADC(如维汀-恩弗妥单抗)进行治疗。

[0680] 在任何实施方案中,治疗方法可任选地包括以下步骤:(a)评估个体中的癌症阶段和/或疾病进展;和(b)如果个体患有复发性、转移性和/或进行性癌症,则向个体施用有效量的本公开的抗Nectin-4抗体药物缀合物。

[0681] 在一些实施方案中,本发明包括治疗患有尿路上皮癌的个体的肿瘤的方法,该方法包括:(a)评估个体的癌症阶段和/或疾病进展;和(b)如果个体患有复发性、转移性和/或

进行性癌症,则向个体施用有效量的本公开的抗Nectin-4抗体药物缀合物。

[0682] 任选地,用本公开的抗Nectin-4抗体药物缀合物治疗的个体可能患有尽管进行了手术和/或用治疗剂(例如化疗剂、抗体、ADC或放射疗法)治疗但仍(例如在期间或之后)具有抗性、无应答、复发和/或进展的癌症(例如,尿路上皮癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌;HER2阳性癌症)、非小细胞肺癌、胰腺癌、卵巢癌、胃癌、结肠直肠癌、头颈部鳞状细胞癌或食道癌)。

[0683] 在本文的任何实施方案中,治疗应答可以根据众所周知的标准来定义和/或评估,例如实体瘤应答评估标准(RECIST),诸如1.1版,参见Eisenhauer等人(2009)《欧洲癌症杂志(Eur. J. Cancer)》45:228-247,或免疫相关应答标准(irRC),参见Wolchock等人(2009)《临床癌症研究(Clinical Cancer Research)》15:7412-7420。

[0684] 任选地,用本公开的抗Nectin-4抗体药物缀合物治疗的个体患有肿瘤或癌症,该肿瘤或癌症在用化疗剂(例如,已知能够被P-糖蛋白(PgP)转运的化疗剂,例如蒽环类(多柔比星、柔红霉素、紫杉烷类(紫杉醇、多西他赛)、长春花生物碱(长春新碱、长春碱、长春地辛)和依托泊苷)治疗后表现出抗性、对治疗无应答或进展。被PgP识别的化合物通常被表征为适度疏水(辛醇与水的分配系数, $\log P > 1$),通常含有在生理条件下带有净阳离子电荷的可滴定质子,并且主要是带有芳族部分的“天然产物”。

[0685] 在一些实施方案中,在没有组合施用化疗剂的情况下使用或施用包括抗Nectin-4抗体、抗体片段的ADC。

[0686] 在其它实施方案中,抗Nectin-4抗体、抗体片段或包含它们的ADC任选地与化疗剂组合使用或施用。示例性化疗剂包括但不限于安吡啶(amsacrine)、博来霉素、白消安(busulfan)、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氟达拉滨、crisantaspase、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素(dactinomycin)、柔红霉素、多西他赛、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基尿素、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、甲酰四氢叶酸(leucovorin)、脂质体多柔比星、脂质体柔红霉素、洛莫司丁、美法仑(melphalan)、巯基嘌呤、美司钠(mesna)、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托蒽醌、奥沙利铂(oxaliplatin)、紫杉醇、培美曲塞(pemetrexed)、喷司他丁(pentostatin)、甲基苄胍(procarbazine)、雷替曲塞、赛特铂(satraplatin)、链脲菌素(streptozocin)、喃氟啶-尿嘧啶(tegar-uracil)、替莫唑胺(temozolomide)、替尼泊苷、噻替派(thiotepa)、硫鸟嘌呤、拓扑替康、苏消安、长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨或它们的组合。在一个实施方案中,将抗Nectin-4抗体、抗体片段(或包含它们的ADC)和化疗剂调配用于分开施用,并且同时或相继施用。

[0687] 任选地,个体可被表征为患有癌症,高癌症在用先前疗法进行先前治疗之前已经进展、复发或对所述先前治疗无应答,任选地进一步其中先前疗法包括施用维汀-恩弗妥单抗和/或施用PD-1中和剂(例如,帕博利珠单抗(pembrolizumab)、阿替利珠单抗(atenzolizumab)、纳武单抗(nivolumab)),任选地其中先前疗法是化疗剂。

[0688] 任选地,在任何实施方案中,个体可被表征为不适合用维汀-恩弗妥单抗治疗,和/或患有不适合或不适应用维汀-恩弗妥单抗治疗的癌症。

[0689] 用于与喜树碱衍生物分子缀合的抗Nectin-4抗体治疗人的示例性治疗方案包括,例如,向患者施用有效量的本公开的抗Nectin-4抗体药物缀合物,其中该方法包括至少

一个施用周期,其中以0.1-10mg/kg体重、0.1-5mg/kg体重、0.1-1mg/kg体重、1-10mg/kg体重或1-5mg/kg体重的剂量施用至少一剂与喜树碱衍生物分子缀合的抗Nectin-4抗体。在一个实施方案中,施用多个剂量,例如至少2个、3个、4个、5个、6个、8个、10个剂量。在一个实施方案中,间隔至少2周、3周或4周施用剂量。在一个实施方案中,施用是每周、每两周、每三周或每四周。

[0690] 在一个实施方案中,本公开的抗Nectin-4抗体药物缀合物通过静脉注射施用。

[0691] 实施例

[0692] 实施例1:共表达Her2、TROP-2、B7H3和Nectin-4的人肿瘤细胞

[0693] 基于不同类型癌症的关键基因组变化的多维图谱,使用癌症基因组图谱 (Cancer Genome Atlas,国家癌症研究所和国家人类基因组研究所之间的合作)对HER2和Nectin-4基因表达进行了研究。特别是在胰腺癌、肺腺癌患者、乳腺癌和膀胱癌患者的样品中观察到HER2和Nectin-4表达的显著相关性。观察到的最高相关性是胰腺癌,相关值:Spearman0.71和Pearson0.78。

[0694] 通过流式细胞术确定SUM185和SUM190人乳腺癌肿瘤细胞系 (Biovit公司 (Biovit inc.))上的HER2和Nectin-4表达。SUM185源自患有ER阴性、PR阴性和HER2阳性乳腺间变性癌患者的胸腔积液。细胞系过度表达Her2。SUM190源自患有ER阴性、PR阴性和HER2阳性(扩增性)乳腺癌的患者的原发性肿瘤。将肿瘤细胞用抗Nectin-4抗体 (ASG-22ME,其被修饰为含有N297Q突变的人IgG1同种型,该突变具有降低的Fc γ 受体结合)、抗TROP-2抗体、抗B7H3抗体或抗Her2抗体(曲妥珠单抗,其被修饰为含有N297Q突变的人IgG1同种型,该突变具有降低的Fc γ 受体结合)以及同种型对照进行染色,浓度为10 μ g/ml(在4 $^{\circ}$ C下),然后用1:200稀释的PE缀合的多克隆山羊抗人抗体进行染色。用Canto II (HTS)通过细胞荧光分析来分析样品。

[0695] 对于HER2和Nectin-4,图1中示出了SUM190人乳腺癌肿瘤细胞的代表性结果,并且图2示出了SUM185人乳腺癌肿瘤细胞的代表性结果。MFI:荧光强度中值。SUM190肿瘤细胞以低至中等水平表达HER2(中值荧光单位为1777)并以低水平表达Nectin-4(中值荧光单位为991)。SUM185细胞以中等至高水平表达HER2(中值荧光单位为2880)并以高水平表达Nectin-4(中值荧光单位为4326)。另外,SUM185细胞以高水平表达TROP-2和B7H3(中值荧光单位分别为17327和11481)。表达数据在下表1中呈现。

[0696] 表1:

	HER2 (MFI)	Nectin-4 (MFI)	TROP-2 (MFI)	B7H3 (MFI)
[0697] SUM185	2880	4326	17327	11481
SUM190	1777	991		

[0698] 实施例2:抗Nectin-4喜树碱衍生物ADC与抗HER2 ADC组合的功效

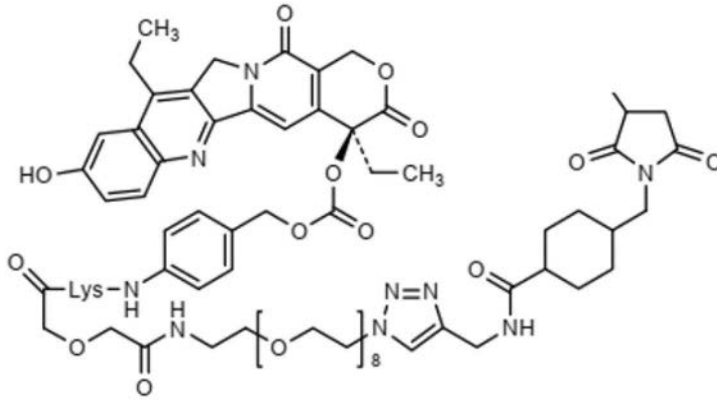
[0699] 制备抗Nectin-4抗体-药物缀合物,并且与曲妥珠单抗抗体-药物缀合物比较对HER2+Nectin4+人肿瘤细胞的功效。制备具有SEQ ID NO:6和7的VH和VL作为人IgG1同种型的抗Nectin-4抗体-药物缀合物。

[0700] N41 VH:

[0701] QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGSTDYN

[0702] AAFISRLSISKDTSKSVFFKMNSLQADDTAIYYCARELIHAMDNWGQGTSTVTSS

[0714]



[0715] 测试所得ADC诱导实施例1的Nectin-4/HER2表达性SUM190(当组合使用时)、MCF-7肿瘤细胞死亡的能力。简而言之,将细胞接种在96孔板中($V=80\mu\text{l}$)。N4 ADC1和HER2 ADC1或人IgG1同种型对照(IC)-接头-毒素或培养基(浓度5x)在1:2系列稀释中从(530nM至30nM)开始进行测试,N4 ADC1和同种型对照在1:5系列稀释中(7nM至 $7 \times 10^{-2}\text{nM}$)进行测试。在从(530 nM开始到 5.3×10^{-2})的1:10连续稀释液中测试N4 ADC2和同种型对照。通过使用Incucyte S3-2装置评估汇合来确定ADC引起细胞死亡的能力;使用Cell Titer Glo™(CTG)测定法用Enspire2装置确定处理后第6天的活力。每个ADC的IC50值用GraphPad Prism8使用第6天的发光细胞活力数据确定。将实验重复两次。

[0716] 结果显示,与单独使用任一种ADC相比,抗Nectin-4 ADC和抗Her2ADC的组合在导致Nectin-4+Her2+肿瘤细胞死亡方面具有提高的效力(较低IC50)。

[0717] 实施例3:具有人框架序列的第一组抗huNectin-4抗体的建模和生成

[0718] 为了引入抗体5E7的CDR,鉴定人VH和VK模板。单独分析每个VH、VJ、VK和JK框架。具有SEQ ID NO:19和20的VH和VL氨基酸序列的亲本抗体然后分别通过将来自人亚组IGHV1-46*01的重链框架(FR1、FR2、FR3)与IGHJ4*01(FR4)一起引入VH中并且将来自人亚组IGKV2-28*01的轻链框架(FR1、FR2、FR3)与IGKJ4*01(FR4)一起引入VL中而进行修饰。

[0719] 使用以下重链和轻链序列来对亲本嵌合抗体Fab(HPLP)建模:

[0720] HP重链(可变结构域加下划线):

[0721] QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKRPGQGLEWIGEIDPSDSYTNYNQKFKGKA
TLTLDKSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCVRGYGNYGDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
 DK(SEQ ID NO:67)

[0722] LP重链(可变结构域加下划线):

[0723] DVVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFS
SSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF
 YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO:68)

[0724] 使用以下重链和轻链序列来对人源化抗体Fab H0L0建模。

[0725] H0重链:

[0726] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRV
TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDK (SEQ ID NO:69)

[0727] L0重链:

[0728] DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:70)

[0729] 对于轻链和重链人源化变体的设计,叠加5E7 HPLP和H0L0三维模型,并且逐一地检查所有氨基酸差异。还评估了残基之间的链内连接和链外连接,以便通过在给定链中引入回复突变(back-mutation)来鉴定并且避免破坏任何重要的低能键。

[0730] 从原始CDR移植开始,通过观察人和小鼠之间的框架差异残基,鉴定了潜在的回复突变。

[0731] 重链设计:

[0732] 为了研究位于位置72(根据Kabat编号的残基71)处的残基的作用,对该残基进行了回复突变,从而保留亲本抗体中存在的亮氨酸。与H0L0抗体的TRD相比,亲本抗体具有序列TLD。该回复突变应与残基79上的回复突变偶联以避免空间冲突。

[0733] 为了研究位于位置79处的残基的作用,对该残基进行了回复突变,从而保留亲本抗体中存在的苏氨酸。与H0L0抗体的TVY相比,亲本抗体具有序列TTY。位置79中的苏氨酸被定向在VH结构域内并且不接触任何其它残基。尽管位置79中的缬氨酸与苏氨酸很好地重叠,但该残基与R72、M34、C22和I51形成许多键。通过与V79(根据Kabat编号的V78)接触来解释I51的旋转异构体位置。在残基72(R72L;根据Kabat编号的残基71)上引入回复突变会在I51和L72之间引入空间冲突,如果V79存在的话。

[0734] 为了研究位于位置74处的残基的作用,对该残基进行了回复突变,从而保留亲本抗体中存在的赖氨酸。与H0L0抗体的DTS相比,亲本抗体具有序列DKS。位置74中的赖氨酸残基暴露在分子表面并且占据关键位置,尽管它不接近潜在结合位点。

[0735] 为了研究位于位置28处的残基的作用,对该残基进行了回复突变,从而保留亲本抗体中存在的异亮氨酸。与H0L0抗体的YTF相比,亲本抗体具有序列YIF。位置28处的异亮氨酸和苏氨酸很好地重叠。它们暴露于分子表面并且位于抗体的顶部,靠近互补位。不能排除该残基可能参与结合。此外,根据IMGT定义,该残基被包括在CDR-H1中。

[0736] 具有SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列的第一重链变体(H1)具有R71L和V78TK取代。具有SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列的第二重链变体(H2)具有R71L、T73K和V78T取代。具有SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列的第三重链变体(H3)具有T28I、R71L、T73K和V78T取代。取代根据Kabat进行编号。

[0737] 轻链设计:

[0738] 为了研究位于位置2处的残基的作用,对该残基进行了回复突变,从而保留亲本抗体中的缬氨酸残基。与H0L0抗体的DIV相比,亲本抗体具有序列DVV。残基V2与位于CDR-L1中的残基K27相互作用,该残基K27进一步与位于CDR-L3中的残基E98相互作用。

[0739] 为了研究位于位置69处的残基的作用,对该残基进行了回复突变,从而保留亲本抗体中的丝氨酸残基。与H0L0抗体的SGS相比,亲本抗体具有序列SSS。残基S69被定向在VL

结构域内部并且与相邻的残基W40和M56 (位于CDR-L2中) 形成许多键, 而G69 (根据Kabat编号的G64) 与M56形成h-结合。所有这些残基都很好地重叠。残基W40是整个内部网络的中心。

[0740] 为了研究位于位置11处的残基的作用, 对该残基进行了回复突变, 从而保留亲本抗体中的天冬酰胺残基。与H0L0抗体的SLP相比, 亲本抗体具有序列SNP。残基L11与残基P8相互作用并且可能使P8β链硬化。

[0741] 为了研究位于位置8处的残基的作用, 对该残基进行了回复突变, 从而保留亲本抗体中的丙氨酸残基。与H0L0抗体的SPL相比, 亲本抗体具有序列SAL。如上所述, 残基P8与残基L11相互作用, 并且此类相互作用可能使P8β链硬化。

[0742] 具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的第一轻链变体 (L1) 具有I2V和G64S取代。具有SEQ ID NO:63的氨基酸序列的第二轻链变体 (L2) 具有I2V、L11N和G64S取代。具有SEQ ID NO:65的氨基酸序列的第三轻链变体 (L3) 具有I2V、P8A、L11N和G64S取代。取代根据Kabat进行编号。

[0743] 相应的重链 (表2中的“H”链) 和轻链 (表2中的“L”链) 可变区的氨基酸序列如下表2所示。

[0744] 表2

链	SEQ ID NO	序列 (氨基酸取代加粗, Kabat CDR 加下划线)
H1	39	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV S CKASGYIF T <u>SYWMIHWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDSYINYNQKFKGRVTMTLDTSTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYG</u> DIYWGQGTLVTVSS
H2	41	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV S CKASGYIF T <u>SYWMIHWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDSYINYNQKFKGRVTMTLDKSTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYG</u> DIYWGQGTLVTVSS
[0745] H3	43	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV S CKASGYIF T <u>SYWMIHWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDSYINYNQKFKGRVTMTLDKSTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYG</u> DIYWGQGTLVTVSS
L1	61	DVVMTQSPVSLPVP T PGEPASISCR S SKSL L HSNGIT Y LYWYLQ K PGQSPQLLIYQ M SNLASGVPDRFSSSGSGTDF T LIKIS R VEAEDVGVYYCA Q LN L EPW T FGGGTK V EIK
L2	63	DVVMTQSPVSLPVP T PGEPASISCR S SKSL L HSNGIT Y LYWYLQ K PGQSPQLLIYQ M SNLASGVPDRFSSSGSGTDF T LIKIS R VEAEDVGVYYCA Q LN L EPW T FGGGTK V EIK
L3	65	DVVMTQSPVSLPVP T PGEPASISCR S SKSL L HSNGIT Y LYWYLQ K PGQSPQLLIYQ M SNLASGVPDRFSSSGSGTDF T LIKIS R VEAEDVGVYYCA Q LN L EPW T FGGGTK V EIK

[0746] 制备具有下表3中所示的重链和轻链组合的抗体。

[0747] 表3

		轻链			
		L0	L1	L2	L3
[0748] 重链	H0	H0L0	H0L1	H0L2	H0L3
	H1	H1L0	H1L1	H1L2	H1L3
	H2	H2L0	H2L1	H2L2	H2L3
	H3	H3L0	H3L1	H3L2	H3L3

[0749] 实施例4: 通过SPR表征与Nectin-4的结合

[0750] 将实施例3的表3中的抗体克隆为人IgG1同种型抗体, 生产并纯化, 然后测试与人Nectin-4的结合。通过SPR分析来评估16种人源化变体的亲和力以及它们的缔合常数和解离常数。表4总结了所有计算的常数 (亲和常数KD (nM)、缔合常数ka (1/Ms) 和解离常数kd (1/s))。

[0751] 具有整个人IGKHV-46*01和IGHJ4*01重链框架以及整个人IGKV-28*01和IGKJ4*01轻链框架的H0L0抗体会导致kd为80.2nM。如表4所示, 其它变体表现出比H0L0更低的KD。

[0752] 重链H3恢复接近亲本抗体的KD值。因此,在H3中引入的回复突变对于人源化抗体的稳定是很重要的。注意到从H0至H3的解离常数值的分级。

[0753] 表4

抗体	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
5E7	5.9±1.2	4.8E+5±1.0E-5	2.7E-3±0.3E-3
H0L0	80.2	1.7E+5	1.4E-2
H1L0	67.3	1.1E+5	7.2E-3
H2L0	46.4	1.3E+5	6.2E-3
H3L0	35.8	1.1E+5	4.1E-3
H3L1	22.0±0.4	4.0E+5±0.3E+5	8.7E-3±0.4E-3
H3L2	25.9	3.1E+5	8.1E-3
H3L3	27.0	2.6E+5	7.0E-3

[0755] 实施例5:具有人框架序列的第二组抗huNectin-4抗体的建模和生成基于实施例3中生成的人源化抗体的SPR数据,设计了新抗体。

[0756] 重链设计

[0757] 为了研究位于位置38处的残基的作用,对该残基进行了回复突变,从而保留亲本抗体中的赖氨酸残基。与H0L0抗体的VRQ相比,亲本抗体具有序列VKQ。K38将是具有残基E46的盐桥的一部分。

[0758] 为了研究位于位置40处的残基的作用,对该残基进行了回复突变,从而保留亲本抗体中的精氨酸残基。与H0L0抗体的QAP相比,亲本抗体具有序列QRP。残基R40与Q43接触,该残基Q43与Q39接触,该残基Q39与轻链的残基Q43形成两个氢键。利用此类回复突变,重链的残基Q43占据趋异位置,但与Q39保持接触,并且两个氢键也与L0-Q43保持接触。

[0759] 为了研究位于位置48处的残基的作用,对该残基进行了回复突变,从而保留亲本抗体中的异亮氨酸残基。与H0L0抗体的WMG相比,亲本抗体具有序列WIG。残基I48与A68、M81和F64(位于CDR-H2中)相互作用。

[0760] 为了研究位于位置70处的残基的作用,对该残基进行了回复突变,从而保留亲本抗体中的亮氨酸残基。与H0L0抗体的TMT相比,亲本抗体具有序列TLT。残基L70与残基M81、I51(其位于CDR-H2中)、Y60(位于CDR-H2中)和W36相互作用。残基M70(根据Kabat编号的M69)与残基I51(位于CDR-H2中)、Y60(位于CDR-H2中)和W36相互作用。除了残基I51占据不同的旋转异构体位置之外,所有其它残基完全重叠,并且两个网络几乎相等。

[0761] 具有SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列的第四重链变体(H4)具有R38K取代。具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的第五重链变体(H5)具有R38K和A40R取代。具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的第六重链变体(H6)具有R38K、A40R和M48I取代。具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的第七重链变体(H7)具有R38K、A40R、M48I和M69L取代。进一步的第八(H8;SEQ ID NO:53)、第九(H9;SEQ ID NO:55)和第十(H10;SEQ ID NO:57)链设计有不同的取代组合。氨基酸残基的编号是根据Kabat进行。

[0762] 相应的重链(表5中的“H”链)和轻链(表5中的“L”链)可变区的氨基酸序列如下表5所示。

[0763] 表5

链	SEQ ID NO	序列 (氨基酸取代加粗, Kabat CDR 加下划线)
[0764] H4	45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFT <u>SYWMH</u> WVKQAPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRVTMTLDKSTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQGITLVTVSS
H5	47	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFT <u>SYWMH</u> WVKQRPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRVTMTLDKSTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQGITLVTVSS
H6	49	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFT <u>SYWMH</u> WVKQRPGQGLEWIG <u>EIDPSDSY</u> TNYNQKFKGRVTMTLDKSTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQGITLVTVSS
H7	51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFT <u>SYWMH</u> WVKQRPGQGLEWIG <u>EIDPSDSY</u> TNYNQKFKGRVTMTLDKSTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQGITLVTVSS
H8	53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFT <u>SYWMH</u> WVKQAPGQGLEWIG <u>EIDPSDSY</u> TNYNQKFKGRVTMTLDKSTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQGITLVTVSS

[0765] 制备具有下表6中所示的重链和轻链组合的抗体。

[0766] 表6

		轻链			
		L0	L1	L2	L3
[0767] 重链	H4	H4L0	H4L1	H4L2	H4L3
	H5	H5L0	H5L1	H5L2	H5L3
	H6	H6L0	H6L1	H6L2	H6L3
	H7	H7L0	H7L1	H7L2	H7L3
	H8		H8L1		

[0768] 实施例6:通过SPR表征与Nectin-4的结合(第二组)

[0769] 将实施例5的表6中的抗体克隆为人IgG1同种型抗体,生产并纯化,然后测试与人Nectin-4的结合。通过SPR分析来评估16种人源化变体的亲和力以及它们的缔合常数和解离常数。表7总结了所有计算的常数(亲和常数KD(nM)、缔合常数ka(1/Ms)和解离常数kd(1/s))。

[0770] 具有整个人IGKHV-46*01和IGHJ4*01重链框架以及整个人IGKV-28*01和IGKJ4*01轻链框架的H0L0抗体会导致kD为80.2nM。如表7所示,其它变体表现出比H0L0更低的KD。特别地,变体H4L1、H5L3和H8L1具有更接近嵌合亲本抗体(其具有5.9nM±1.2的KD)的KD。

[0771] 表7

人源化变体	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
ch5E7	5.9 ± 1.2	4.8E+5 ± 1.0E-5	2.7E-3 ± 0.3E-3
H0L0	80.2	1.7E+5	1.4E-2
H4L1	19.5 ± 0.8	3.1E+5 ± 0.3E+5	5.9E-3 ± 0.3E-3
H4L2	26.8	2.0E+5	5.4E-3
H4L3	21.6 ± 1.1	2.5E+5 ± 0.3E+5	5.2E-3 ± 0.2E-3
H5L1	24.5	2.3E+5	5.6E-3
H5L2	23.8	2.2E+5	5.3E-3
H5L3	21.5 ± 0.4	2.5E+5 ± 0.1E+5	5.3E-3 ± 0.0E-3
H6L1	32.1	1.9E+5	6.2E-3
H6L2	41.3	1.4E + 5	5.8E-3
H6L3	38.6	1.3E+5	5.1E-3
H7L1	29.7	2.0E+5	6.0E-3
H7L2	39.5	1.6E+5	6.3E-3
H7L3	49.0	1.1E+5	5.5E-3
H8L1	19.2	2.5E+5	4.8E-3

[0774] 实施例7:通过流式细胞术测定来表征与Nectin-4的结合

[0775] 克隆、生产并纯化实施例3的表3和实施例5的表6中的人源化抗体,然后通过流式细胞术来测试与表达Nectin-4的细胞的结合。在表达高水平Nectin-4的SUM190细胞系上测定人IgG1形式的人源化变体的结合。在下表8中示出了在饱和阶段代表MedFi的EC50和最大MedFi。

[0776] 所有具有L0或L1链的人源化变体都具有比其它变体更低的结合能力(较低的高原期)。相反,所有携带L2或L3链的人源化变体与亲本嵌合5E7抗体(ch5E7)相比都具有相似的结合能力。变体H5L3表现出最高的MedFi值。

[0777] 表8

抗体	EC ₅₀	最大MedFi
ch5E7	1.10	25213
H0L0	0.542	15507
H1L0	0.64	17251
H2L0	0.45	16704
H3L0	0.88	17596
H3L1	1.79	17208
H3L2	1.19	22887
H3L3	1.45	23814

H4L1	1.49	18399
H4L2	1.44	24352
H4L3	1.60	24840
H5L1	1.43	18263
H5L2	1.14	25276
H5L3	1.29	27095
H6L1	1.15	18263
H6L2	1.30	24779
H6L3	1.01	24840
H7L1	1.27	17816
H7L2	1.30	23404
H7L3	1.23	25026
H8L1	1.63	17251

[0779] 实施例8:细胞内内化测定

[0780] 克隆、生产并纯化实施例3的表3和实施例5的表6中的人源化变体,然后测试它们诱导Nectin-4内化的能力。嵌合亲本5E7抗体和同种型对照被用作阴性对照。用Fab-ZAP人内化试剂盒测定进行该分析,使用Cell Titer Glo™ (CTG) 测定作为读出。实验在表达不同水平的Nectin-4的两种细胞系上进行。MDA-MB-468具有比SUM190更低的Nectin-4表达。

[0781] 对SUM190细胞系的内化测定

[0782] 对SUM190细胞系的内化测定的结果示于下表9中,该表呈现内化效率(归一化成对SUM190细胞系的嵌合亲本抗体内化效率)。该实验进行两次(两个独立的实验)。

[0783] 表9

[0784]

抗体	对 SUM190 的内化效率 (归一化成嵌合亲本抗体内化潜力)	
嵌合亲本 5E7	100.0	100.0
H0L0	65.9	35.4
H1L0	83.7	58.6
H2L0	74.2	61.8
H3L0	81.4	69.7
H3L1	82.1	41.0
H3L2	69.8	45.5
H3L3	65.3	59.6
H4L1	73.5	72.6
H4L2	83.6	67.6
H4L3	81.9	61.0
H5L1	71.5	52.4
H5L2	81.3	86.0
H5L3	82.8	74.9
H6L1	71.3	54.5
H6L2	69.7	63.5
H6L3	78.7	92.8
H7L1	128.7	73.1
H7L2	89.6	74.8
H7L3	88.5	61.3
H8L1	131.9	65.2

[0785] 在对SUM190细胞系进行的实验中确定的内化效率表明,与亲本抗体(5E7)相比,人源化变体H3L0、H4L2、H5L2、H5L3、H6L3和H7L2诱导75%或更多的内化,因此表现出令人感兴趣的内化潜力。应当注意,在第1次实验中,H8L1和H7L1变体比嵌合5E7更有效,但在第2次实验中没有证实该结果。

[0786] 对MDA-M-468细胞系的内化测定

[0787] 对SUM190细胞系的内化测定的结果示于下表10中,该呈现内化效率(归一化成对MDA-M-468细胞系的嵌合亲本抗体内化效率)。该实验进行两次(两个独立的实验)。

[0788] 表10

抗体	对 MDA-MB-468 的内化效率 (归一化成嵌合亲本抗体内化效率)	
嵌合亲本 5E7	100.0	100.0
H0L0	-36.2	-36.2
H1L0	-7.4	-7.4
H2L0	-35.5	-35.5
H3L0	1.2	1.2
H3L1	48.2	48.2
H3L2	13.7	13.7
H3L3	43.8	43.8
H4L1	31.0	31.0
H4L2	64.2	64.2
H4L3	43.8	43.8
H5L1	33.4	33.4
H5L2	39.4	39.4
H5L3	87.8	87.8
H6L1	61.6	61.6
H6L2	58.5	58.5
H6L3	66.3	66.3
H7L1	79.0	79.0
H7L2	58.7	58.7
H7L3	51.8	51.8
H8L1	71.2	71.2

[0789]

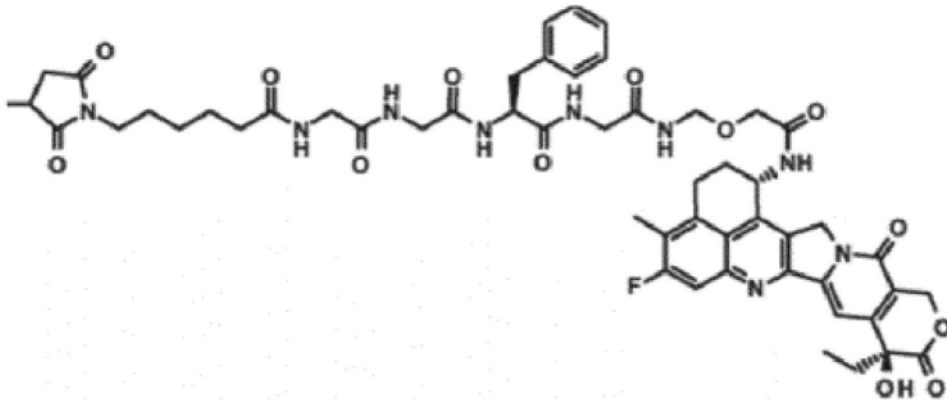
[0790] 所获得的结果表明,仅H5L3人源化变体一致地达到超过75%的亲本嵌合5E7抗体的功效,而所有其它变体的功效较低,并且它们中的许多在实验之间具有异质结果。

[0791] 实施例9:作为ADC的抗体对肿瘤细胞系的体外细胞毒性

[0792] Nectin-4低/SUM 190乳腺癌模型

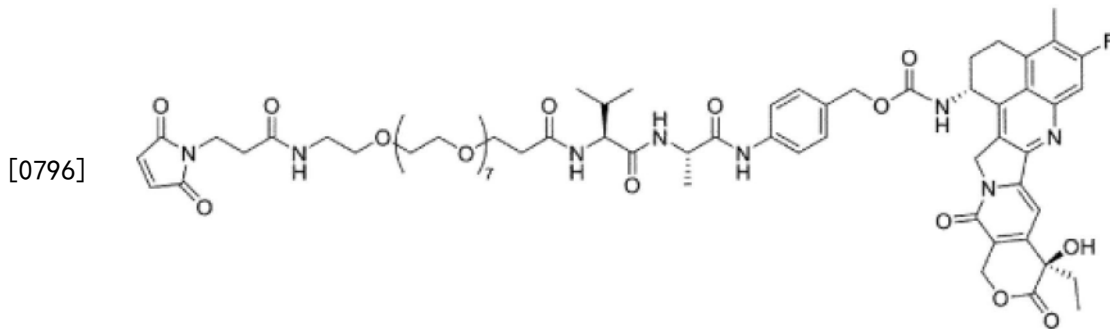
[0793] 我们评估了与喜树碱类似物(Dxd或依喜替康)缀合的5E7抗体杀死SUM190细胞的能力。在这个实验中,对5E7抗体,连同以相等药物/抗体比率与相同毒素缀合的抗Ig样V结构域抗体恩弗妥单抗和N41及对照抗体一起进行了测试。制备第一ADC,其中通过接头以8个毒素/抗体(DAR=8)将抗体缀合(至半胱氨酸残基)至喜树碱类似物(Dxd),该接头包含具有以下所示结构的细胞内可切割的四肽接头(GGFG),称为ggfg-Dxd:

[0794]



[0795] 制备第二ADC,其中通过可切割接头以8个毒素/抗体(DAR=8)将抗体缀合至另一种喜树碱类似物(依喜替康),该可切割接头具有以下结构,称为PEG(8U)-Val-Ala-PAB-依

喜替康:



[0797] 简而言之,将不同剂量范围(起始点150nM,3个点的稀释因子2,然后5个点的稀释因子5)的每种测试抗体与细胞一起温育5天,然后通过添加CTG底物测量细胞活力。将发光与抗体浓度绘制在图表上。

[0798] 对于每种ADC,将一定浓度范围的ADC与nectin-4表达性细胞一起温育。温育后,以1/1的比率添加CTG底物,并且用读板器(Enspire)读取发光信号。允许定量存在的ATP(代谢活性细胞的指示物),其与细胞活力成正比。

[0799] 结果示于图3A中。图3A示出了5E7抗体以及同种型对照抗体(IC)对人乳腺癌细胞的杀伤,该5E7抗体与喜树碱类似物Dxd(通过GGFG-Dxd接头)或依喜替康(通过(PEG(8U)-Val-Ala-PAB-依喜替康)接头)缀合,全部以相等的药物/抗体比(DAR=8),并且与V结构域结合Enhertu™(曲妥珠单抗德卢替康(抗HER2))比较。

[0800] 所有Nectin-4靶向的ADC都比非靶向的ADC(IC-GGFG-喜树碱)更高效地降低细胞活力。

[0801] SUM185、MDA-MB-468、MC38和B16F10细胞系

[0802] 进一步测试与依喜替康(通过PEG(8U)-Val-Ala-PAB-依喜替康接头)缀合的抗体5E7对其它癌细胞系的细胞杀伤。图3B示出了“5E7-依喜替康”(缀合至依喜替康接头(PEG(8U)-Val-Ala-PAB-依喜替康)的5E7)能够引起HER-2和Nectin-4表达性SUM185和SUM190以及MDA-MB-468(TNBC)人肿瘤细胞和人Nectin-4表达性MC38(结肠癌)和B16F10(黑色素瘤)鼠肿瘤细胞的死亡的功效。细胞活力的EC50值如下表11所示。

[0803] 表11

[0804]

细胞系	MDA-MB-468	SUM185	SUM190	MC38-huN4	B16F10-huN4
EC ₅₀ (nM)	1.5E+05	3E+05	7E+05	2.3E+5	9.8E+5

[0805] 实施例10:ADC在人乳腺癌小鼠模型(Nectin-4低/SUM190模型)中的体内功效

[0806] 我们在人乳腺癌小鼠模型中比较了作为喜树碱ADC的5E7抗体与恩弗妥单抗和N41的功效。在这个实验中,将5E7抗体连同以8个毒素/抗体(DAR=8)的相等药物/抗体比与ggfg-Dxd接头缀合的恩弗妥单抗和N41及对照抗体一起测试。

[0807] 将SUM190细胞皮下移植到CB17-SCID免疫缺陷小鼠中,剂量为100μl Matrigel中50万个细胞,生长因子在PBS中以1/2稀释。当肿瘤达到介于195mm³和250mm³之间的体积时,将小鼠随机分成9只小鼠的组,单次注射3mg/kg喜树碱ADC进行静脉内治疗。每周两次跟踪肿瘤生长。使用GraphPad Prism V7软件根据以下标准建立Kaplan Meier生存曲线:当肿瘤体积达到1500mm³时,小鼠被安乐死并在处死当天被认为死亡(D)。当肿瘤出现坏死迹象时,

小鼠被安乐死并在同一天被认为死亡(D) (在个体肿瘤生长的图表上用红色星号表示)。

[0808] 结果显示,在10mg/kg剂量下,所有ADC在防止肿瘤体积增加方面类似地高效。然而,在较低剂量的ADC (3mg/kg) 下,抗体5E7显示出很强的阻止肿瘤生长的能力,而N41和恩弗妥单抗都不再显示出控制肿瘤生长的能力。图4中示出了3mg/kg剂量的结果。

[0809] 实施例11:ADC在药物抗性的乳腺癌模型(人乳腺癌,HER2/Nectin-4高/SUM185模型)中的比较性体外功效

[0810] 我们接下来评估了与PADCEV™(维汀-恩弗妥单抗)和ENHERTU™相比,与喜树碱类似物缀合的5E7抗体杀死SUM185细胞的能力。这种设置被用作抗HER2抗性的模型。SUM185细胞以相对较高的水平表达Nectin-4,这些细胞中的Nectin-4表达水平约为HER2表达水平的两倍(参见实施例1)。在这个实验中,将5E7抗体作为具有DAR=8的ADC与PADCEV™(DAR=4, FDA批准的PADCEV™的规格)和对照抗体一起测试,这些对照抗体均以相等的药物/抗体比与相同的毒素缀合。5E7通过ggfg-Dxd接头与喜树碱类似物Dxd缀合。

[0811] 简而言之,将不同剂量范围(起始点150nM,3个点的稀释因子2,然后5个点的稀释因子5)的每种测试抗体在细胞上温育5天,然后通过添加CTG底物测量细胞活力。将发光与抗体浓度绘制在图表上。

[0812] 对于每种ADC,将一定浓度范围的ADC与nectin-4表达性细胞一起温育。温育后,以1:1的比率添加CTG底物,并且用读板器(Enspire)读取发光信号,从而允许量化存在的ATP(代谢活性细胞的指示物),其与细胞活力成正比。

[0813] 结果示于图5中。5E7-ggfg-Dxd和PADCEV™能够比ENHERTU™更高效地杀死SUM185。在每种情况下,Nectin-4靶向的ADC比它们的非靶向ADC(IC)对应物更高效地降低细胞活力。

[0814] 实施例12:抗Nectin-4抗体的物种交叉反应性的表征

[0815] 通过流式细胞术测试抗Nectin-4抗体与被制备成分别表达小鼠、食蟹猴和大鼠Nectin-4蛋白(包括在以下序列中未示出的N末端V5标签)的不同CHO细胞系的结合。

[0816] 由细胞表达的蛋白质的成熟氨基酸序列如下:

[0817] 小鼠Nectin-4:

[0818] ELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDEQVGVAVARVDPNEGIRELALLHSHKYGLHVNPAVEDRVEQ
PPPPRDPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLPPLPSLNPGPPLEEGQGLTLAASCTAEGS
PAPSVTWDETEVKGQTSSRSFTHPRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDRRITHLTLQVAFLAEASVRG
LEDQNLWQVREGATLTKCLSEGQPPPKNWTRLDGPLPSGVRVKGDTLGFPLTTEHSGVYVCHVSNELSSRDSQV
TVEVLDPEDPGKQVDLVSASVIVGVIAALLFCLLVVVVVLMSRYHRRKAQQMTQKYEEELTLTRENSIRRLSHH
SDPRSQPEESVGLRAEGHPDSLKDSSCSVMSEEPEGRSYSTLTTVREIETQTELLSPGSGRTEEDDDQDEGIKQA
MNHVQENGTLRAKPTGNGIYINGRHLV (SEQ ID NO:12)

[0819] 大鼠Nectin-4:

[0820] MPLSLGAEMWGPEAWLLLLFLASFTGRYSAGELETSDLVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDEQVGVAVAR
VDPNEGTRRELALLHSHKYGLHVSPAYEDRVEQPPPPRDPLDGSILLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRV
LVPPLPSLNPGPPLEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDETEVKGQTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPL
TCVVSHPGLLQDQRITHLTLQVAFLAEASVRGLEDQNLWHVREGATLTKCLSEGQPPPKNWTRLDGPLPSGVRVKG
DTLGFPLTTEHSGVYVCHVSNELSSRASQVTVEVLDPEDPGKQVDLVSASVVVGVIAALLFCLLVVVVVLMSRY

HRRKAQQMTQKYEEELTLTRENSIRRLSHHTDPRSQPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPEGRSYSTLTT
VREIETQTELLSPGSGRTEEEEDDQDEGIKQAMNHVQENGLTRAKPTGNGIYINGRHLV (SEQ ID NO:13)

[0821] 食蟹猴Nectin-4:

[0822] GELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGVAVARADAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVE
QPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPLPSLNP GPAL EEGQGLTLAASCTAEG
SPAPSVTDTEVKGTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVR
GLEDQNLWHVREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQ
VTVDVLDPQEDSGKQVDLVSASVVVGVIAALLFCLLVVVVLM SRYHRRKAQQMTQKYEEELTLTRENSIRRLHS
HHTDPRSQPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPEGRSYSTLTTVREIETQTELLSPGSGRTEEEEDDQDEGIK
QAMNHVQENGLTRAKPTGNGIYINGRHLV (SEQ ID NO:14)

[0823] 抗体5E7结合人、食蟹猴以及大鼠Nectin 4蛋白,但缺乏与小鼠Nectin 4蛋白的结合。图6A和图6B示出了抗Nectin-4抗体在大鼠和食蟹猴Nectin-4表达性CHO细胞系上的结合。

[0824] 实施例13:Nectin家族交叉反应性的表征

[0825] 通过流式细胞术测试抗Nectin-4抗体与被制备成分别表达人Nectin 1、Nectin 2、Nectin 3和PVR蛋白的不同CHO细胞系的结合。分别用已知的抗人Nectin1、抗人Nectin2、抗人Nectin3和抗人PVR抗体控制和验证每种细胞系的表达。由细胞表达的蛋白质的成熟氨基酸序列如下:

[0826] Nectin-1:

[0827] MGLAGAAGRWWGLALGLTAFPLPGVHSQVVQVND SMYGFIGTDVVLHCSFANPLPSVKITQVTWQKST
NGSKQNVAIYNPSMGVSVLAPYRERVEFLRPSFTDGTIRLSRLELEDEGVYICEFATFP TGNRESQLNLTVM AKPT
NWIEGTQAVLRAKKGQDDKVLVATCTSANGKPPSVVSWETRLKGEAEYQEIRNPNGTVTVISRYRLVPSREAHQQS
LACIVNYHMDRFKESLTLNVQYEPEVTIEGFDGNWYLQRMDVKLTCKADANPPATEYHWTTLNGLPKGVEAQNRT
LFFKGPINYSLAGTYICEATNPIGTRSGQVEVNITEFPYTPSPPEHGRRAGPVPTAIIGGVAGSILLVLI VVGIV
VALRRRRHTFKGDYSTKKHVYNGYKAGIPQHHPMAQNLQYPDDSDDEKKAGPLGGSSYYYYYYYYYEGGGGGER
KVGPPHPKYDEDAKRPYFTVDEAEARQDGYGDRTLGYQYDPEQLDLAENMVSQNDGSFISKKEWYV (SEQ ID NO:
15)

[0828] Nectin-2:

[0829] MARAAALLPSRSPPTLLWPLLLLLLLETGAQDVRVQVLPEVRGQLGGTVELPCHLLPPVPGLYISLVT
WQRPDAPANHQNVAAFHPKMGPSFPSPKPGSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATALHGLTVEDEGNYTCEFATFP
KGS

[0830] VRGMTWLRVIAKPKNQAEAQKVTFSDPTTVALCISKEGRPPARISWLSS
LDWEAKETQVSGTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVTVTCKVEHESFEEP
ALIPVTLVRYPPPEVSISGYDDNWYLGRTDATLSCDVRSNPEPTGYDWST
TSGTFPTSAVAQGSQVLVIHAVDSLNTTFVCTVTNAVGMGRAEQVIFVRE
TPNTAGAGATGGIIGGIIAIIATAVAATGILICRQQRKEQTLQGAEEDEDL
EGPPSYKPPTPKAKLEAQEMPSQLFTLGASEHSPLKTPYFDAGASCTEQE
MPRYHELPTLEERSGPLHPGATSLGSPVPPGPPAVEDVSLDLEDEEGEE
EEEYLDKINPIYDALSYSSPSDSYQGGKGFVMSRAMYV (SEQ ID NO: 16)

[0831] Nectin-3:

MARTLRPSPLCPGGGKAQLSSASLLGAGLLLQPPTPPPLLLLLFPLLLFSRLC
GALAGPIIVEPHVTA VWGKNVSLKCLIEVNETITQISWEKIHGKSSQTVAVH
HPQYGFSVQGEYQGRVLFKNYSLNDATITLHNIGFSDSGKYICKAVTFPLG
NAQSSTTVTVLVEPTVSLIKGPDSLIDGGNETVAAICIAATGKPVAHIDWEG
DLGEMESTTTSFPNETATIISQYKLPTRFARGRRITCVVKHPALEKDIRYSFI
LDIQYAPEVSVTGYDGNWVGRKGVNLKCNADANPPPFKSVWSRLDGQW
PDGLLASDNTLHFVHPLTFNYSGVYICKVTNSLGQRSDQKVIYISDPPTTTT
LQPTIQWHPSTADIEDLATEPKKLPFPLSTLATIKDDTIATIIASVVGALFIV
LVSVLGIFCYRRRRTFRGDYFAKNYIPPSDMQKESQIDVLQQDELDSYPD
SVKKENKNPVNNLIRKDYLEEPEKTQWNNVENLNRFERPMDYYEDLKM
MKFVSDEHYDENEDDLVSHVDGSGVISRREWYV (SEQ ID NO:17)

[0833] PVR (Nectin-5) :

DVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGEGSM
AVFHQTQGPSYSESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNYTCLF
VTFPQGSRSVDIWLRLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPMARCVSTGGRPP
AQITWHSDLGGMPNTSQVPGFLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCKVE
HESFEKPQLLTVNLTVYYPPPEVSISGYDNNWYLGQNEATLTCDARSNPEP
TGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLIRPVDKPIINTLICNVTNALGARQAE
LTVQVKEGPPSEHSGISRNAIFLVLGILVFLILLGIGIYFYWSKCSREVLWH
CHLCPSSTEHASASANGHVSYSAVSRENSSSQDPQTEGTR (SEQ ID NO: 18)

[0835] 结果显示,抗Nectin-4抗体对人Nectin家族成员没有交叉反应性。图显示了抗Nectin-4抗体对表达人Nectin 1、人Nectin 2、人Nectin 3和人PVR的CHO细胞的流式细胞术结果。没有抗体呈现出与各细胞系结合。

[0836] 实施例14:通过SPR通过竞争结合Nectin-4的表位作图

[0837] 通过SPR(表面等离子体共振)方法以及使用Ni-NTA(NTA)生物传感器(ForteBio)的OCTET分析,测试嵌合抗体5E7以及先前报道的抗体N4.1(N41)、抗体14A5和恩弗妥单抗彼此竞争结合野生型人Nectin-4蛋白的能力。简而言之,将在Kinetic缓冲液10X中稀释至5 μ

g/mL的人Nectin4-His-BirA蛋白捕获到生物传感器上。注射在Kinetic缓冲液10X中稀释至10μg/mL的第一抗体,然后第二次注射在Kinetic缓冲液10X中稀释至10μg/mL的第一抗体,以便使信号饱和。注射在Kinetic缓冲液10X中稀释至10μg/mL的第二抗体。

[0838] 结果示出在下表12中。黑色方块表示第一抗体和第二抗体之间的实质性或直接竞争(第一抗体阻止第二抗体的结合/引起第二抗体的结合的丧失),具有X的方块表示潜在的部分竞争(第一抗体引起第二抗体的结合的潜在减少但不丧失),白色方块表示无竞争。抗体5E7彼此竞争结合Nectin-4。

[0839] 表12

		注射的第二 mab				
		5E7	恩弗妥单抗	N41	14A5	MABT64
[0840] 注射的第一 mAb	5E7	■		⊗	⊗	⊗
	恩弗妥单抗	⊗	■			
	N41			■		■
	14A5				■	
	MABT64					■

[0841] 实施例15:使用Nectin-4点突变体的抗体的表位作图

[0842] 细胞表面表达的人Nectin-4点突变体

[0843] 抗Nectin-4抗体在全长和Ig样V结构域缺失蛋白上的结合谱、以及抗体的物种结合谱(结合人、食蟹猴和大鼠Nectin-4,但不结合小鼠Nectin-4)、以及非人Nectin-4蛋白之间的物种间差异,允许鉴定Ig样V结构域和Ig样C21型结构域(也称为“C1”)的连接处的残基。与公开的Nectin-4结构域的结构组合,设计了表面暴露的氨基酸残基处的Nectin-4突变。基于蛋白质数据库参考:4FRW(结构域V和C1),对Nectin-4结构域结构建模。使用的人Nectin-4是NCBI参考序列:NP_112178.2,使用的小鼠Nectin-4是NCBI参考序列:AAL79833.1,使用的食蟹猴Nectin-4是NCBI参考序列:XP_005541277.1,使用的大鼠Nectin-4是NCBI参考序列:NP_001102546.1。表达Nectin-4突变体的细胞然后用于测试抗Nectin-4抗体与不同Nectin-4突变体的结合丧失,以鉴定结合Nectin-4上的相同位点的抗体。特别地,在残基K197T和/或S199A处具有C1-V连接处取代的突变体,或在结构域C1和V的连接处具有额外和/或相邻取代的突变体7、7bis和9,可鉴定具有作为免疫缀合物的有利应用的抗体。突变体7具有取代S195A/K197T/S199A。突变体7bis具有取代A72P/G73N/K197T/S199A。突变体9包括关键残基Q234取代,并且具有取代L150S/S152A/Q234R/1236S。图7A和图7B示出了人Nectin-4蛋白的分子模型,表明了突变体7(7A)和突变体7bis(7B)中的取代残基的位置;这些突变体在C1结构域中鉴定在Nectin-4蛋白的相对面上的结构域C1和V结构域的连接处的两个位点。图8A和图8B示出了人Nectin-4蛋白的分子模型的不同视图,表明了突变体1、2、3、4、5、6、7、8和9中的取代残基的位置。

[0844] 通过PCR生成Nectin-4突变体。扩增的序列在琼脂糖凝胶上电泳,并且使用

Macherey Nagel PCR Clean-Up Gel Extraction试剂盒纯化。然后用ClonTech InFusion系统将为每种突变体生成的纯化的PCR产物连接到表达载体中。将含有突变序列的载体制成Miniprep并且测序。测序之后,使用Promega PureYield™质粒Midiprep系统,将含有突变序列的载体制成Midiprep。在测试转基因表达之前,使HEK293T细胞在DMEM培养基(英杰公司(Invitrogen))中生长,使用英杰公司的Lipofectamine 2000用载体转染并且在37℃下在CO₂温育箱中温育48小时。在Hek-293T细胞中转染突变体,如下表所示。靶向氨基酸突变在下表13中示出,该表列出了存在于野生型Nectin-4中的残基/存在于突变体Nectin-4中的残基/残基的位置,位置参考是具有SEQ ID NO:1中示出的前导肽的Nectin-4蛋白。

[0845] 表13

突变体	参考具有SEQ ID NO:1的Nectin-4的氨基酸取代
1	S58P/G59D/Q61A/N106D/P107A
2	V90S/P92A/A93S/E95A/G96D
3	A76S/Q77R/E78A/S9 1N
4	A72P/G73N/G75S
5	A158P/E160G/S243A/F244S
6	H238A/I239T/H241Q
7	S195A/K197T/S199A
7bis	A72P/G73N/K197T/S199A
8	T190A/T191Q/S193A
9	L150S/S152A/Q234R/I236S

[0847] 抗体与Nectin-4突变体之间的缔合结果在下表14中示出。(+)意指发生抗体-Nectin-4缔合。(-)意指未发生抗体-Nectin-4缔合。与突变体5相关的结果是无关的,因为不存在所述蛋白质的表达。

[0848] 表14

	EXPI培养基 (阴性对照)	突变体 1	突变体 2	突变体 3	突变体 4	突变体 5	突变体 6	突变体 7	突变体 7bis	突变体 8	突变体 9
CHG1-M-1N4-5E7	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
恩弗妥单抗	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
N41	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
14A5.2	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+

[0850] 因此,抗体5E7在Nectin-4上具有结合位点,该结合位点涵盖在突变体7和7bis (S195A/K197T/S199A和A72P/G73N/K197T/S199A)中突变的C1结构域残基。因此,抗体5E7结合与恩弗妥单抗、N41和14A5(它们结合Nectin-4的V结构域上的表位)不同的Nectin-4上的

表位。

[0851] 实施例16:依喜替康ADC的体内功效

[0852] 人乳腺癌细胞系SUM190PT在以下含有Ham's F12、FBS1g/L、HEPES 10mM、乙醇胺5mM、胰岛素5 μ g/mL、氢化可的松1 μ g/mL、脱铁转铁蛋白5 μ g/mL、三碘甲状腺原氨酸(T3)6.7ng/mL、亚硒酸钠8.7ng/mL的细胞培养基中培养。

[0853] 使用7周龄至8周龄的免疫缺陷CB17-SCID小鼠。产生抗Nectin-4抗体(恩弗妥单抗、5E7和6A7,其各自具有人Fc区),并且将它们通过细胞内可切割的接头ggfg-Dxd或PEG(8U)-Val-Ala-PAB-依喜替康与有效载荷Dxd(德卢替康)或依喜替康缀合。抗体6A7是5E7共享大多数CDR,具有可比较的Nectin-4结合亲和力并且结合Nectin-4上的相同位点(对于6A7氨基酸序列,参见2021年11月24日提交的PCT/EP2021/082872)。ggfg-Dxd接头将在切割时释放Dxd(德卢替康),并且PEG(8U)-Val-Ala-PAB-依喜替康接头将在切割时释放依喜替康。

[0854] 将SUM190细胞皮下移植到CB17-SCID免疫缺陷小鼠中,剂量为100 μ l Matrigel中50万个,该Matrigel含有在PBS中以1/2稀释的生长因子。在第21天,当肿瘤根据实验达到146.9mm³ \pm 63.2mm³或213.2mm³ \pm 77.5mm³的平均体积时,根据实验将小鼠随机分成8只或9只小鼠的组,并且通过单次注射3mg/kg体重或10mg/kg体重的ADC或作为对照的PBS进行静脉内治疗。每周两次跟踪肿瘤生长。使用GraphPad Prism V7软件根据以下标准建立Kaplan Meier生存曲线:当肿瘤体积达到1500mm³时,小鼠被安乐死并在处死当天被认为死亡(D)。当肿瘤高度坏死时,小鼠被安乐死并在同一天被认为死亡(D)。

[0855] 图9A和图9B中呈现了3mg/kg剂量的结果,其中可以看出,被发现丧失与具有K197T/S199A突变的Nectin-4结合的抗IgVC1 ADC 5E7-ggfg-Dxd在限制小鼠中肿瘤生长方面表现出最高的效率。此外,与缀合至被设计成在接头切割时释放Dxd的ggfg-Dxd的5E7相比,缀合至被设计成在接头切割时释放依喜替康的PEG(8U)-Val-Ala-PAB-依喜替康的5E7在控制小鼠中的肿瘤生长方面显示出更高的效率,如图9C中的10mg/kg剂量所示。

[0856] 实施例17:ADC在Pg-p表达性癌症模型中的体外功效

[0857] 内源性表达MDR1 P-糖蛋白(PgP)的MC-38细胞被工程化以表达Nectin-4并在DMEM+10%FBS中培养。在ADC的存在下,用媒介物(DSMO)或用已知作为PgP抑制剂的环孢菌素A(5 μ M,DMSO中的储备溶液)处理细胞。所测试的ADC如下:

[0858] (a) PADCEV™,

[0859] (b) 通过在切割时释放Dxd的ggfg-Dxd接头缀合至德卢替康(Dxd)的抗体5E7(5E7-GGFG-DxD),和

[0860] (c) 通过在切割时释放依喜替康的PEG(8U)-Val-Ala-PAB-依喜替康接头缀合至依喜替康的抗体5E7(5E7-依喜替康)。

[0861] ADC和等效同种型对照ADC以150nM至2.310⁻³nM的剂量范围使用。与细胞共温育5天后,通过加入Cell Titer Glo™(CTG)底物来测量细胞活力。将发光与抗体浓度作图。

[0862] 图10A示出了用Padcev™(维汀-恩弗妥单抗)、缀合至Dxd的抗体5E7或缀合至依喜替康的5E7处理的细胞的发光(指示细胞活力)。具有依喜替康(5E7-依喜替康)作为有效负载的ADC在这种药物抗性设置中高度有效地降低细胞活力。图10B示出了在存在或不存在Pgp抑制剂环孢素的情况下,以150nM ADC并归一化成对照抗体,用Padcev™(维汀-恩弗妥单

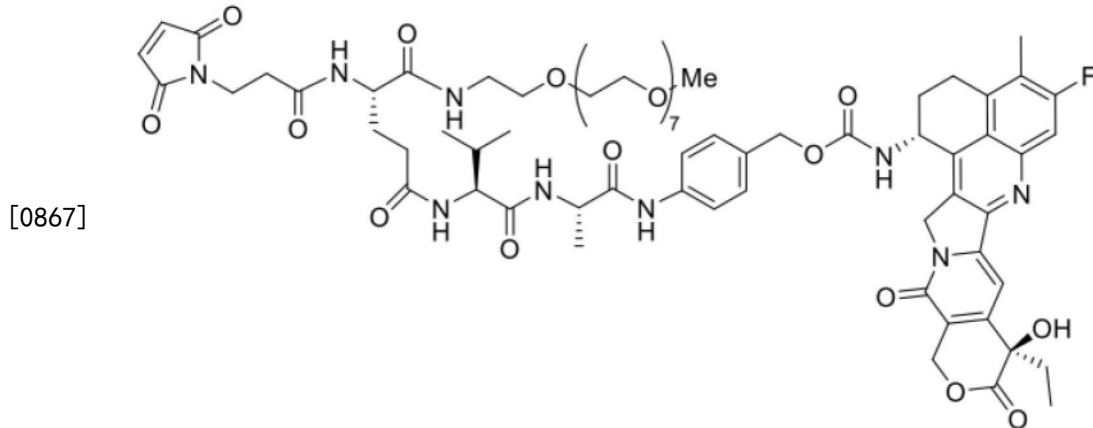
抗)、缀合至Dxd的抗体5E7或缀合至依喜替康的5E7处理的MC38细胞的肿瘤生长(曲线下面积)。结果表明,在缀合至依喜替康的5E7是高度有效的浓度下,Padcev™和缀合至Dxd的抗体5E7的抗肿瘤活性受到Pgp的负面影响。

[0863] 实施例18:支化PEG-二肽-依喜替康ADC的体内功效

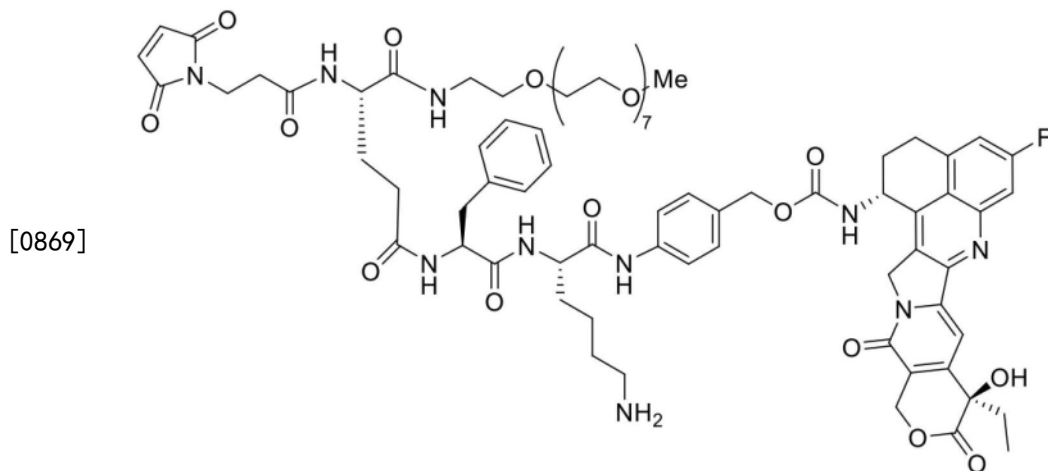
[0864] 将抗VC结构域抗Nectin-4抗体通过不同的支化PEG接头缀合至依喜替康,并且在体内SUM190肿瘤模型(Nectin-4低/SUM190乳腺癌模型)中评估所得的ADC。

[0865] 制备ADC,其中抗VC结构域抗-Nectin-4(N4)人IgG1同种型抗体6A7(在半胱氨酸残基处)以每抗体8个毒素(DAR=8)通过不同的接头缀合至依喜替康。如下测试接头-毒素:

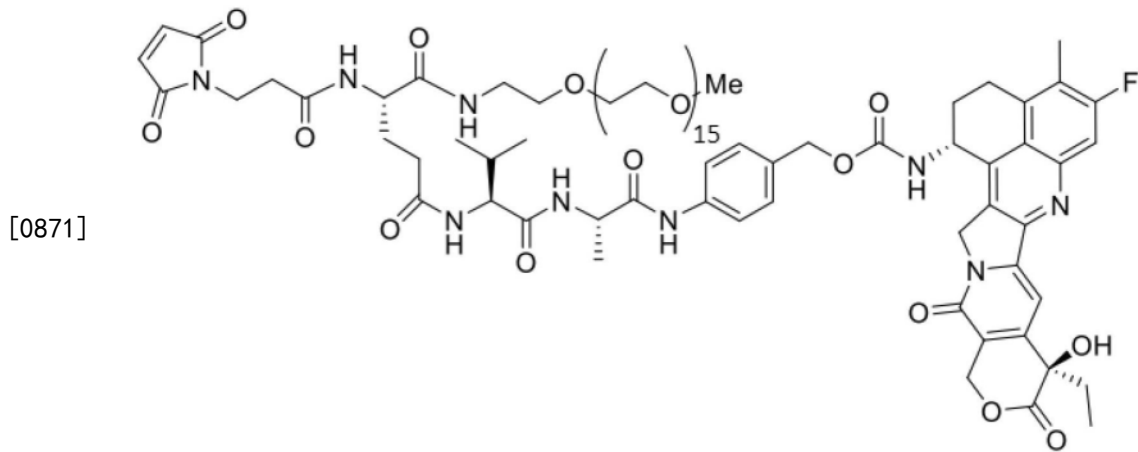
[0866] VA-PAB-依喜替康-PEG(8U):



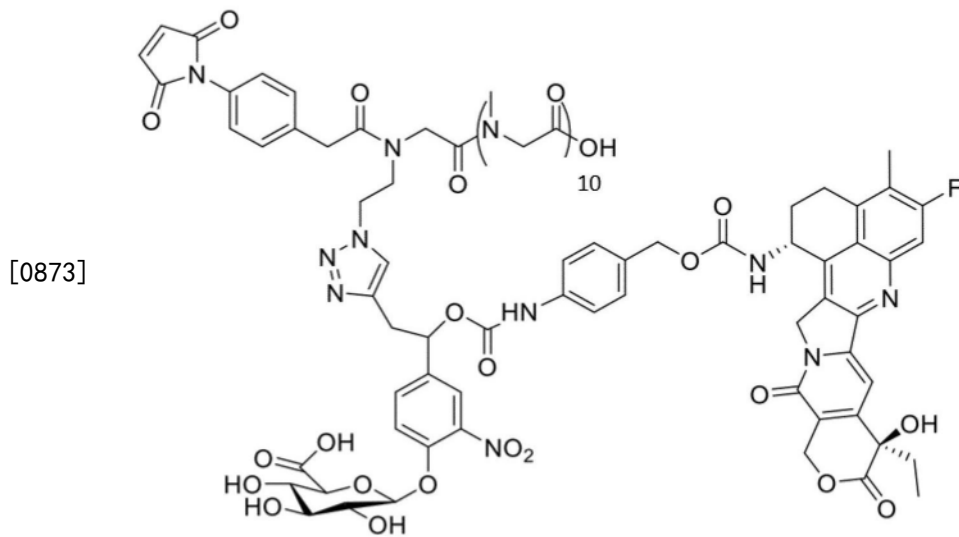
[0868] FK-PAB-依喜替康-PEG(8U):



[0870] VA-PAB-依喜替康-PEG(16U):



[0872] PSAR10-依喜替康:

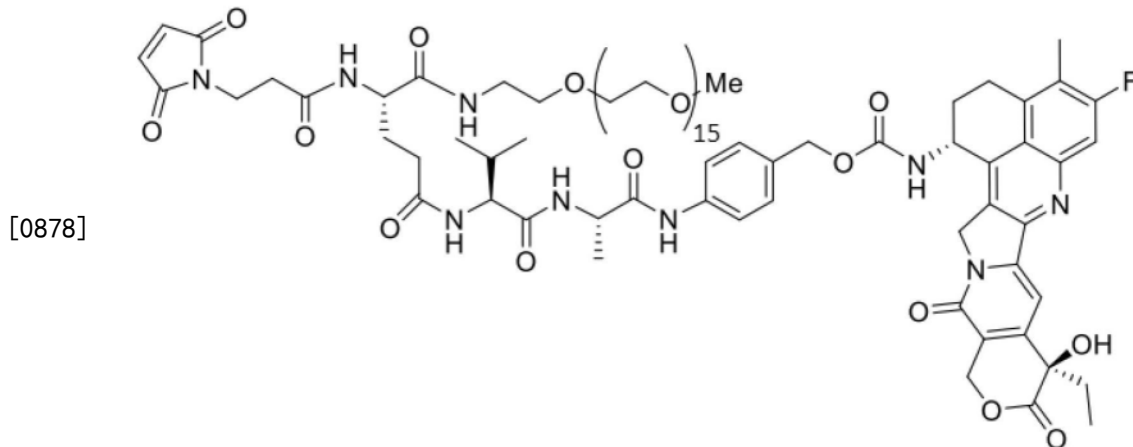


[0874] 将SUM190细胞皮下移植到CB17-SCID免疫缺陷小鼠中,剂量为100 μ l Matrigel中50万个细胞,生长因子在PBS中以1/2稀释。当肿瘤达到介于200mm³和250mm³之间的体积时,将小鼠随机分成10只小鼠的组,单次注射3mg/kg ADC进行静脉内治疗。每周两次跟踪肿瘤生长。使用GraphPad Prism V7软件根据以下标准建立Kaplan Meier生存曲线:当肿瘤体积达到1500mm³时,小鼠被安乐死并在处死当天被认为死亡(D)。当肿瘤出现坏死迹象时,小鼠被安乐死并在同一天被认为死亡(D) (在个体肿瘤生长的图表上用红色星号表示)。

[0875] 结果表明,在3mg/kg剂量下,所有ADC在防止肿瘤体积增加方面高效。作为游离毒素(未与抗Nectin-4抗体缀合,表示为“IC”)施用的不同接头-毒素在防止肿瘤生长方面效率较低。图11中示出了IC(游离毒素)的结果。图12中示出了ADC的结果。

[0876] 实施例19:支化PEG-二肽-依喜替康ADC的体内药代动力学和功效

[0877] 将抗VC结构域抗Nectin-4抗体6A7在(DAR=8)处通过VA-PAB-依喜替康-PEG(16U)接头(结构如下所示)缀合至依喜替康,并且在体内SUM190肿瘤模型(Nectin-4低/SUM190乳腺癌模型)中以不同的较低剂量进行评估。该实验测试了高达1mg/kg体重的不同给药方案,并且评估了抗肿瘤功效与循环中ADC浓度的相关性。



[0879] 将SUM190细胞皮下移植到CB17-SCID免疫缺陷小鼠中,剂量为100 μ l Matrigel中50万个细胞,生长因子在PBS中以1/2稀释。当肿瘤达到介于150mm³和250mm³之间的体积时,将小鼠随机分组,每组20只小鼠,用PBS作为对照,或以0.11mg/kg、0.33mg/kg、0.66mg/kg或1mg/kg体重(分别为2.2 μ g、6.6 μ g、13.2 μ g和20 μ g剂量)单次注射ADC进行静脉内治疗。在同一天测量肿瘤生长并获得血浆样品,血浆样品在5分钟、5h(小时)、24小时后处理,然后血浆样品和肿瘤生长在72小时、第7天进行测量,然后每周测量。

[0880] 结果示于图13中。图13,左上图,示出了PBS没有阻止肿瘤体积的增加。图13,右上图,示出了1mg/kg剂量ADC的结果,其表明强抗肿瘤功效。图13,下图,示出了血浆中ADC的浓度随时间的变化,表明在ADC显示出抗肿瘤活性期间ADC保持可检测。

[0881] 实施例20:支化PEG-二肽-依喜替康ADC的体内安全性

[0882] 以3mg/kg体重至30mg/kg体重的剂量范围进行与VA-PAB-依喜替康-PEG(16U)接头在DAR-8处缀合的抗VC结构域抗Nectin-4抗体的剂量范围研究。

[0883] 在第一实验中,在第1天和第22天以3mg/kg、10mg/kg或30mg/kg体重通过静脉推注向Sprague Dawley大鼠注射ADC。在研究过程中收集血浆样品(n=3个雄性/时间点/剂量水平),并且通过ELISA测量总抗Nectin-4抗体(总抗体;TA)(DAR \geq 0)和ADC(DAR \geq 1)的浓度,并且通过LC-MS测量游离的依喜替康(Exa)。

[0884] 图14A示出了3mg/kg剂量(上图)和10mg/kg剂量(下图)的结果,并且图14B示出了30mg/kg剂量的结果。对于每种分析物,在LLOQ/2处绘制低于定量下限(LLOQ)的浓度值。Y轴代表以ng/mL计的分析物血浆浓度,并且X轴代表以天计的时间。符号和条显示每组的平均值和标准偏差。

[0885] 在第二实验中,在第1天和第22天以3mg/kg、10mg/kg或30mg/kg体重通过静脉推注向毛里求斯食蟹猴注射ADC。在研究过程中收集血浆样品(n=1个雄性和1个雌性/剂量水平),并且通过ELISA测量总抗Nectin-4抗体(总抗体;TA)(DAR \geq 0)和ADC(DAR \geq 1)的浓度,并且通过LC-MS测量游离的依喜替康(Exa)。

[0886] 图15A示出了3mg/kg剂量(上图)和10mg/kg剂量(下图)的结果,并且图15B示出了30mg/kg剂量的结果。对于每种分析物,在LLOQ/2处绘制低于定量下限(LLOQ)的浓度值。Y轴代表以ng/mL计的分析物血浆浓度,并且X轴代表以天计的时间。符号和条显示每组的平均值和标准偏差。

[0887] 大鼠和非人灵长类动物中的结果均证明,ADC在最高测试剂量(30mg/kg体重)下是

安全的和良好耐受的。

[0888] 本文引用的所有参考文献(包括出版物、专利申请和专利)据此全文以引用方式并入本文,就好像每篇参考文献单独且具体地指示为以引用方式并入并在本文中完全阐述一样(达到法律所允许的最大程度),而不管在本文其他地方对特定文档进行的任何单独提供的并入。

[0889] 除非另外指明,否则本文提供的所有精确值都表示对应的近似值(例如,相对于特定因子或测量值提供的所有精确示例性值可被认为也提供对应的近似测量值,在适当的情况下由“约”修饰)。在“约”与数字结合使用的情况下,这可以被指定为包含对应于指定数字的 $\pm 10\%$ 的值。

[0890] 本发明使用如“包含(comprising)”、“具有(having)”、“包括(including)”或“含有(containing)”等术语的本文对任何方面或实施方案的描述旨在提供对本发明的“由该一个或多个特定元素组成”、“基本上由该一个或多个特定元素组成”或“基本上包含该一个或多个特定元素”的类似方面或实施例的支持,除非另有说明或明确与上下文矛盾(例如,本文描述的包含特定元素的组合物应理解为还描述由该元素组成的组合物,除非另有说明或明确与上下文矛盾)。

[0891] 除非另外受权利要求书保护,否则本文提供的任何和所有示例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅旨在更好地说明本发明,并且不对本发明的范围构成限制。说明书中的任何语言都不应被解释为指示任何不受权利要求书保护的元素对于本发明的实践是必要的。

[0892] 表15

[0893]

SEQ ID NO:	描述	序列
1	具有信号肽的 hNectin-4	MPLSLGAEMW GPEAWLLLLL LLASFTGRCP AGELETSADV TVVLGQDAKL PCFYRGDSGE QVGQVAWARV DAGEGAQELA LLHSHYGLHV SPAYEGRVEQ PPPRNPLDG SVLLRNAVQA DEGEYECRVS TFPAGSFQAR LRLRVLPPL PSLNPGPALE EGQGLTLAAS CTAEGSPAPS VTWDTEVKGT TSSRSFKHSR SAAVTSEFHL VPSRSMNGQP LTCVVSHPL LQDQRITHIL HVSFLAEASV RGLDQNLWH IGREGAMKLC LSEGQPPPSY NWTRLDGPLP SGVRVDGDTL GFPPLTTEHS GIYVCHVSNE FSSRDSQVTV DVLDPEQEDSG KQVDLVSASV VVGVIAALL FCLLVVVVL MSRYHRRKAQ <i>QMTQKYEEL TLTRENSIRR</i> <i>LHSHHTDPRS QPEESVGLRA EGHPDSLKDN</i> <i>SSCSVMSEEP EGRSYSTLTT VREIETQTEL LSPGSGRAEE</i> <i>EEDQDEGIKQ AMNHVQENG TLRAKPTGNG</i> <i>IYINGRHLV</i>
2	免疫中使用的 hNectin-4	GRCPAGELETSADVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVG QVAWARVDAGEGAQELALLHSHYGLHVSPAYEGRVE QPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSF QARLRLRVLPPLPSLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGS PAPSVTWDTEVKGTTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRS MNGQPLTCVVSHPLQDQRITHILHVSFLAEASVRGL EDQNLWHIGREGAMKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLP SGVRVDGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVT VDVLDPEQEDSGKQVDLVSASV
3	V 结构域	GELETSADVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAW ARVDAGEGAQELALLHSHYGLHVSPAYEGRVEQPPP RNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLR LR
4	Ig 样 C2 1 型	PPLPSLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTE VKGTTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCV VSHPLQDQRIT

5	Ig 样 C2 2 型	ASVRGLEDQNLWHIGREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTR LDGPLPSGVRVDGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSS RDSQVTVDVLDPQEDSGKQVDLVSASV
6	N41 VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKGLEWLGVIWSSGGSTDYNAAFISRLSISKDTSKSQ VFFKMNSLQADDTAIYYCARELIHAMDNWGQGTSVTV SS
7	N41 VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQ KQGNPQLLVFAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKIN SLQSEDFGTYYCQHFHWGTPTFGGGTKLEIK
8	人 Nectin4-His-BirA	GELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAW ARVDAGEGAQELALLHISKYGLHVSPA YEGRVEQPPPP RNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLR LRVLVPPLPSLNP GPAL EEGQGLTLAASCTAEGSPAPSV TWDTEVKGTTSSRSFKHSR SAAVTSEFHLVPSRSMNGQ PLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVRGLEDQNL WHIGREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRV DGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVDVLD PQEDSGKQVDLVSASHHHHHHLLHHILDAQKMWVWNR
9	野生型 N4 构建体	GELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGQVAW ARVDAGEGAQELALLHISKYGLHVSPA YEGRVEQPPPP RNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLR LRVLVPPLPSLNP GPAL EEGQGLTLAASCTAEGSPAPSV TWDTEVKGTTSSRSFKHSR SAAVTSEFHLVPSRSMNGQ PLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVRGLEDQNL WHIGREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRV DGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVDVLD PQEDSGKQVDLVSASVVVGVIAALLFCLLVVVVLM SRYHRRKAQQMTQKYEEL TLTRENSIRRLHSHHTDPR SQPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPEGRSYSTL TTVREIETQTELLSPGSGRAEEEEEDQDEGIKQAMNHFV QENGLTRAKPTGNGIYINGRHLV
10	C1C2 构建体	PPLPSLNP GPAL EEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWD TEVKGTTSSRSFKHSR SAAVTSEFHLVPSRSMNGQPL TCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVRGLEDQNL WHIGREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVR VDGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVD VLDPQEDSGKQVDLVSASVV VGVIAALLFCLLVVVVLM SRYHRRKAQQMTQKY EELTLTRENSIRRLHSHHTDPRSQPEESVGLRAEGHP DSLKDNSSCSVMSEEPEGRSYSTLTTVREIETQTELLS PGSGRAEEEEEDQDEGIKQAMNHFVQENGLTRAKPT GNGIYINGRHLV

[0894]

[0895]

11	C2 构建体	ASVRGLEDQNLWHIGREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTR LDGPLPSGVRVDGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSS RDSQVTVDVLDLPQEDSGKQVDLVSASVVVGVIAALL FCLLVVVVLMMSRYHRRKAQQMTQKYEEELTLTRENS IRRLHSHHTDPRSQPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSV MSEEPEGRSYSTLTTVREIETQTELLSPGSGRAEEEDQ DEGIKQAMNHFVQENGTLRKPTGNGIYINGRGHLV
12	小鼠 Nectin-4-V5	ELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDEQVGVQAWA RVDPNEGIRELALLHSKYGLHVNPAYEDRVEQPPPPRD PLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARMRL RVLVPPLPSLNPGPPEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVT WDTEVKGTQSSRSFTHPRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQP LTCVVSHPGLLQDRRITHTLQVAFLAEASVRGLEDQNL WQVGREGATLKCLSEGQPPPKYNWTRLDGPLPSGVRV KGDTLGFPLTTEHSGVYVCHVSNELSSRDSQVTVEVL DPEDPGKQVDLVSASVIIVGVIAALLFCLLVVVVLMMS RYHRRKAQQMTQKYEEELTLTRENSIRRLHSHHSDPRS QPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPEGRSYSTLT TVREIETQTELLSPGSGRTEEDDDQDEGIKQAMNHFVQ ENGTLRKPTGNGIYINGRGHLV
13	大鼠 Nectin-4 V5	MPLSLGAEMWGPEAWLLLLFLASFTGRYSAGELETSD LVTVVVGQDAKLPCFYRGDPDEQVGVQAWARVDPNE GTRELALLHSKYGLHVSPAYEDRVEQPPPPRDPLDGSIL LRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLVPPLP SLNPGPPEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKG TQSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSH PGLLQDQRITHTLQVAFLAEASVRGLEDQNLWHVREG ATLKCLSEGQPPPKYNWTRLDGPLPSGVRVKGDTLGF PLTTEHSGVYVCHVSNELSSRASQVTVEVLDPEDPGKQ VDLVSASVVVGVIAALLFCLLVVVVLMMSRYHRRKA QQMTQKYEEELTLTRENSIRRLHSHHTDPRSQPEESVGL RAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPEGRSYSTLTTVREIETQ TELLSPGSGRTEEDDDQDEGIKQAMNHFVQENGTLRK PTGNGIYINGRGHLV
14	食蟹猴 Nectin-4 V5	GELETSDVVTVVVGQDAKLPCFYRGDSGEQVGVQAW ARADAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVEQPPPP RNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLR LRVLVPPLPSLNPGPALPEGQGLTLAASCTAEGSPAPSV TWDTEVKGTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQ PLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVRGLEDQNL WHVREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRV DGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVDVLD PQEDSGKQVDLVSASVVVGVIAALLFCLLVVVVLM MSRYHRRKAQQMTQKYEEELTLTRENSIRRLHSHHTDPR SQPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPEGRSYSTL TTVREIETQTELLSPGSGRTEEEEDQDEGIKQAMNHFVQ ENGTLRKPTGNGIYINGRGHLV

[0896]

15	Nectin-1	<p>MGLAGAAGRWWGLALGLTAFPLPGVHSQVVQVND MYGFIGTDVVLHCSFANPLPSVKITQVTWQKSTNGSKQ NVAIYNPSMGVSVLAPYRERVEFLRPSFTDGTIRLSRLE LEDEGVYICEFATFPTGNRESQLNLTVMAPTNWIEGT QAVLRAKKGQDDKVLVATCTSANGKPPSVVSWETRL KGAEYQEIRNPNGT VTVISRYRLVPSREAHQQSLACIV NYHMDRFKESLTLNVQYEPEVTIEGFDGNWYLQRMDD KLTCKADANPPATEYHWTTLNGSLPKGVEAQNRTLFF KGPINYSLAGTYICEATNPIGTRSGQVEVNITEFPYTPSP PEHGRRAGPVPTAIIGGVAGSILLVLIVGGIVVALRRR RHTFKGDYSTKHKVYNGYSGKAGIPQHHPMAQNLQY PDDSDEK KAGPLGGSSYEEEEEEEEGGGGGERKVG PHPKYDEDAKRPYFTVDEAEARQDGYGDRTLGYQYDP EQDLAENMVSQNDGSFISKKEWYV</p>
16	Nectin-2	<p>MARAAALLPSRSPPTPLLWPLLLLLLLETGAQDVRVQV LPEVRGQLGGTVELPCHLLPPVPLYISLVTWQRDPAP ANHQNVAAFHPKMGPSFPSPKPGSERLSFVSAKQSTGQ DTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTCEFATFPKGSVRG MTWLRVIAKPKNQAEAKVTFSQDPTTVALCISKEGRP PARISWLSSLDWEAKETQVSGTLAGTVTVTSRFTLVPS GRADGVTVTCKVEHESFEPPALIPVTLVRYPPPEVSISG YDDNWYLGRTDATLSCDVRNPEPTGYDWSTTSGTFP TSAVAQSQLVIHAVDSLNTTFVCTVTNAVGMGRAE QVIFVRETPNTAGAGATGGIIGGIIAIIATAVAATGILIC RQQRKEQTLQGAEEDEDELEPPSYKPPTPKAKLEAQE MPSQLFTLGASEHSPLKTPYFDAGASCTEQEMPRYHEL PTLEERSGPLHPGATSLGSPVPPGPPAVEDVSLDLEDE EEEEEYLDKINPIYDALSYSSPSDSYQKGFVMSRA MYV</p>
17	Nectin-3	<p>MARTLRPSPLCPGGGKAQLSSASLLGAGLLLQPPTPPPL LLLFPLLLFSRLCGALAGPIIVEPHVTA VVWGKNVSLKC LIEVNETITQISWEKIHGKSSQTVAVHHPQYGFVQGEY QGRVLFKNYSLNDATITLHNIGFSDSGKYICKAVTFPLG NAQSSTTVTVLVEPTVSLIKGPDSLIDGGNETVAAICIAA TGKPVAHIDWEGDLGEMESTTTSFPNETATIISQYKLP TRFARGRRITCVVVKHPALEKDIRYSFILDIQYAPEVSVT GYDGNWFVGRKGVNLKCNADANPPPFSVWSRLDGGQ WPDGLLASDNTLHFVHPLTFNYSVYICKVTNSLGQRS DQKVYISDPPTTTTLQPTIQWHPSTADIEDLATEPKLP FPLSTLATIKDDTIATIIASVVGALFIVLVSVLGIFCYR RRRTFRGDYFAKNYIPPSDMQKESQIDVLQQDELDSYP DSVKKNKNPVNNLIRKDYLEEPEKTQWNNVENLNRF ERPMDYYEDLKMGMKFSDEHYDENEDDLVSHVDGS VISRREWYV</p>

[0897]

18	PVR Nectin-5	DVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQ L TWARHGESGSMVAFHQQTQGPSYSESKRLEFVAARLGA ELRNASLRMFGLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVDIWL RVLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPMARCVSTGGRPPAQ ITWHSDLGGMPNTSQVPGFLSGTVTVTSLWILVPSSQV DGKNVTCKVEHESFEKPQLLTVNLTVYYPPEVSISGYD NNWYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPF AVAQGAQLLIRPVDKPIINTTLCNVTNALGARQAELTV QVKEGPPSEHSGISRNAIIFLVLGILVFLILLGIGIYFYWS KCSREVLWHCHLCPSSTEHASASANGHVSYSAVSRENS SSQDPQTEGTR
19	5E7 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHW VKQRPGQGLEWIGEIDPSDSYTNYNQKFKGKATLTDK SSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCVRGYGNYGDYWGQGT TLTVSSASTKGP
20	5E7 VL	DVVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSHNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSSSGSGTDFD LRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGTKLEIKRTV AAP
21	5E7 CDR-H1 Kabat	SYWMH
22	5E7 CDR-H2 Kabat	EIDPSDSYTNYNQKFKG
23	5E7 CDR-H3 Kabat	GYGNYGDY
24	5E7 CDR-L1 Kabat	RSSKSLLSHNGITYLY
25	5E7 CDR-L2 Kabat	QMSNLAG
26	5E7 CDR-L3 Kabat	AQNLELPWT
27	5E7 CDR-H1 IMGT	GYIFTSYW
28	5E7 CDR-H2 IMGT	IDPSDSYT
29	5E7 CDR-H3 IMGT	VRGYGNYGDY
30	5E7 CDR-L1 IMGT	KSLLSHNGITY
31	5E7 CDR-L2 IMGT	QMS
32	5E7 CDR-H1 Chotia	GYIFTSY
33	5E7 CDR-H2 Chotia	PSDS
34	5E7 CDR-H3 Chotia	YGNYG
35	5E7 CDR-L1 Chotia	SKSLLSHNGITY
36	5E7 CDR-L3 Chotia	NLELPW
37	5E7 H0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHW VRQAPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWG QGTLVTVSS

[0898]

38	5E7 H0 DNA	CAG GTT CAG CTG GTT CAG TCA GGT GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGA GCT AGC GTG AAA GTG TCC TGC AAA GCC TCT GGC TAC ACC TTT ACC TCC TAT TGG ATG CAC TGG GTA CGA CAG GCA CCA GGA CAA GGG CTG GAA TGG ATG GGC GAA ATC GAT CCC TCT GAC AGC TAC ACG AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGT AGG GTC ACT ATG ACT CGC GAC ACA TCC ACC AGT ACC GTC TAC ATG GAG CTC TCC AGT TTG CGG TCT GAG GAT ACA GCC GTG TAC TAC TGT GCC AGA GGC TAT GGC AAT TAT GGG GAC TAT TGG GGA CAA GGG ACA CTG GTC ACT GTG AGC TCA
39	5E7 H1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHW VRQAPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRVTMTL DTSTSTTYMELSSLRSEDVAVYYCARGYGNYGDYWGQ GTLVTVSS
40	5E7 H1 DNA	CAG GTT CAG CTG GTC CAG AGT GGT GCA GAA GTG AAG AAA CCT GGC GCT TCA GTG AAG GTA TCC TGC AAA GCC TCT GGG TAC ACC TTT ACC TCC TAT TGG ATG CAC TGG GTT CGC CAA GCT CCA GGA CAG GGC TTG GAA TGG ATG GGA GAG ATC GAT CCC TCT GAC TCC TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGA AGG GTG ACG ATG ACT CTC GAC ACT AGC ACC AGC ACA ACC TAC ATG GAG CTG AGT TCA CTT CGG TCT GAG GAT ACT GCC GTC TAC TAC TGT GCC AGA GGC TAT GGG AAT TAT GGG GAC TAT TGG GGT CAA GGC ACA CTG GTG ACA GTG TCC AGC
41	5E7 H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMH WVRQAPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRVTM TLDKSTSTTYMELSSLRSEDVAVYYCARGYGNYGDY WGQGLTVTVSS
42	5E7 H2 DNA	CAG GTG CAG CTG GTT CAG TCA GGA GCA GAG GTC AAG AAA CCT GGT GCT TCT GTG AAG GTG TCC TGC AAA GCC AGT GGC TAT ACC TTT ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTT CGG CAA GCT CCA GGT CAG GGC TTG GAA TGG ATG GGA GAG ATC GAT CCC TCA GAC TCC TAC ACG AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAA GGG AGG GTA ACC ATG ACA CTG GAC AAG TCT ACA TCC ACC ACT TAC ATG GAG CTG AGT TCT CTT CGC TCC GAA GAT ACT GCC GTG TAC TAC TGT GCC AGA GGC TAT GGG AAT TAT GGC GAC TAT TGG GGA CAA GGG ACT CTC GTG ACA GTC AGC AGC
43	5E7 H3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYWMHW VRQAPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRVTMTL DKSTSTTYMELSSLRSEDVAVYYCARGYGNYGDYWG QGTLVTVSS

[0899]

44	5E7 H3 DNA	CAG GTT CAG CTG GTC CAG TCA GGT GCA GAA GTG AAG AAA CCT GGA GCT AGC GTG AAG GTG TCC TGC AAA GCC TCT GGC TAC ATC TTT ACC TCC TAT TGG ATG CAC TGG GTA CGC CAA GCT CCA GGT CAG GGG TTG GAA TGG ATG GGA GAG ATT GAT CCC TCT GAC AGC TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAA GGA CGG GTT ACC ATG ACA CTG GAC AAG TCC ACT TCA ACG ACC TAC ATG GAG CTT TCC TCT CTG AGG AGT GAG GAT ACT GCC GTG TAC TAC TGT GCC AGA GGG TAT GGC AAT TAT GGG GAC TAT TGG GGC CAA GGC ACA CTC GTC ACA GTG AGC AGT
45	5E7 H4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYWMHW VKQAPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRVTMTL DKSTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYG DYWG QGTLVTVSS
46	5E7 H4 DNA	CAG GTT CAG CTC GTT CAG TCT GGA GCC GAA GTG AAG AAA CCA GGT GCT AGC GTG AAA GTG AGT TGC AAG GCT TCC GGC TAC ATC TTT ACC AGC TAT TGG ATG CAC TGG GTC AAA CAG GCA CCT GGA CAA GGG TTG GAG TGG ATG GGA GAG ATT GAT CCC TCA GAC TCC TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGC AGG GTA ACC ATG ACA CTG GAC AAG TCC ACG AGT ACT ACC TAC ATG GAA CTG TCC TCT CTT CGG TCT GAG GAT ACA GCC GTG TAC TAC TGT GCC AGA GGG TAT GGC AAT TAT GGG GAC TAT TGG GGT CAA GGC ACT CTG GTC ACA GTG AGC TCA
47	5E7 H5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYWMHW VKQAPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRVTMTL DKSTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYG DYWG QGTLVTVSS
48	5E7 H5 DNA	CAG GTT CAG CTC GTT CAG TCA GGT GCA GAA GTC AAG AAA CCA GGA GCT AGC GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ATC TTT ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AAA CAG CGC CCT GGT CAA GGA CTG GAA TGG ATG GGC GAG ATT GAT CCC AGT GAC AGC TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAA GGC AGG GTG ACC ATG ACA CTG GAC AAG TCC ACT TCA ACC ACG TAC ATG GAG CTC AGT TCC CTT CGG TCT GAG GAT ACA GCC GTC TAC TAT TGT GCC AGA GGG TAT GGC AAT TAT GGG GAC TAT TGG GGA CAA GGC ACA CTG GTC ACA GTG AGC TCA
49	5E7 H6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYWMH WVKQAPGQGLEWIGEIDPSDSYTNYNQKFKGRVTMT LDKSTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYG DYWG QGTLVTVSS

[0900]

50	5E7 H6 DNA	CAG GTT CAG CTC GTT CAG AGT GGA GCA GAG GTG AAG AAA CCA GGA GCT TCA GTC AAG GTA TCC TGC AAA GCC TCT GGC TAC ATC TTT ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AAA CAA CGC CCT GGA CAA GGG TTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC GAT CCC TCC GAT TCC TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTG ACG ATG ACA CTG GAC AAG TCT ACA TCC ACT ACC TAC ATG GAA CTC AGC TCA CTT CGG AGT GAG GAC ACA GCC GTC TAT TAC TGT GCT AGG GGC TAT GGG AAT TAT GGC GAC TAT TGG GGT CAG GGT ACT CTG GTC ACA GTG AGC TCA
51	5E7 H7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYWMHW VKQRPQGGLWIGIEDPSDSTNYNQKFKGRVTLTDK STSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQGT LTVSS
52	5E7 H7 DNA	CAG GTT CAG CTC GTT CAG TCA GGC GCT GAA GTC AAG AAA CCC GGA GCA TCC GTG AAG GTG TCC TGT AAG GCC TCT GGG TAC ATC TTT ACG AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AAA CAG AGG CCT GGT CAA GGG CTT GAG TGG ATT GGA GAG ATC GAT CCA AGC GAC TCA TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAA GGT CGC GTT ACA CTG ACT CTG GAC AAG AGT ACC TCC ACC ACC TAC ATG GAA CTG AGT TCT TTG CGG TCT GAG GAT ACA GCC GTG TAT TAC TGC GCT AGA GGG TAT GGC AAT TAT GGC GAC TAT TGG GGA CAA GGC ACA CTG GTC ACA GTG AGC TCA
53	5E7 H8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYWMH WVKQAPQGGLWIGIEDPSDSTNYNQKFKGRVTMT LDKSTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYW GQGT LTVSS
54	5E7 H8 DNA	ACA GGC GTG CAT TCG CAG GTT CAG CTG GTA CAG TCA GGT GCC GAA GTG AAG AAA CCT GGT GCA TCC GTC AAA GTG AGC TGC AAA GCC AGT GGG TAC ATC TTT ACC TCC TAT TGG ATG CAC TGG GTT AAG CAG GCT CCA GGA CAA GGG TTG GAG TGG ATT GGC GAA ATC GAT CCC TCA GAC TCC TAC ACG AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTG ACA ATG ACT CTG GAC AAG TCT ACC TCT ACC ACC TAT ATG GAG CTG TCT AGC CTT CGG AGT GAG GAT ACA GCC GTG TAC TAC TGT GCT AGG GGA TAC GGG AAT TAT GGC GAC TAT TGG GGA CAA GGC ACA CTC GTC ACT GTG TCC AGC GCG AGC ACC AAG GGC
55	5E7 H9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYWMH WVKQAPQGGLWIGIEDPSDSTNYNQKFKGRVTMT LDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYW GQGT LTVSS

[0901]

56	5E7 H9 DNA	ACA GGC GTG CAT TCG CAG GTT CAG CTG GTT CAG TCT GGC GCT GAA GTC AAG AAA CCT GGA GCC AGT GTC AAG GTG TCA TGC AAA GCT TCC GGG TAC ATC TTT ACG AGC TAT TGG ATG CAC TGG GTG AAA CAG GCA CCA GGA CAA GGG TTG GAG TGG ATT GGT GAG ATC GAT CCC TCA GAC AGC TAC ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGT AGG GTA ACC ATG ACA CTG GAC AAG TCC ACA AGC ACC GTG TAC ATG GAA CTC TCC TCT CTT CGG AGT GAG GAT ACT GCC GTG TAC TAC TGT GCC AGA GGC TAT GGC AAT TAT GGG GAC TAT TGG GGA CAA GGC ACT CTG GTC ACA GTG TCC TCT GCG AGC ACC AAG GGC
57	5E7 H10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYWMHW VKQAPGQGLEWVGEIDPSDSTYNQKFKGRVTMTLD KSTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGNYGDYWGQ GTLVTVSS
58	5E7 H10 DNA	ACA GGC GTG CAT TCG CAG GTA CAG CTG GTT CAG TCA GGT GCT GAG GTG AAG AAG CCA GGT GCA TCC GTG AAG GTC AGC TGC AAA GCC TCT GGG TAC ATC TTT ACC AGC TAT TGG ATG CAC TGG GTG AAA CAG GCT CCT GGA CAA GGA CTG GAA TGG GTT GGG GAG ATT GAC CCC AGT GAC TCC TAT ACC AAC TAC AAC CAG AAG TTC AAA GGG AGG GTC ACG ATG ACT CTC GAC AAG TCA ACC TCC ACA ACC TAC ATG GAA CTG TCC TCT TTG CGG AGT GAG GAT ACA GCC GTG TAC TAC TGT GCC AGA GGC TAT GGC AAT TAT GGC GAT TAC TGG GGA CAA GGC ACT CTT GTC ACA GTG AGC TCT GCG AGC ACC AAG GGC
59	5E7 L0	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGKVEIK
60	5E7 L0 DNA	GAC ATC GTG ATG ACA CAG AGT CCC TTG TCC TTG CCT GTG ACT CCT GGA GAA CCC GCT AGC ATT AGC TGC AGA AGC AGC AAG TCC CTT CTC CAC TCT AAC GGC ATA ACC TAT CTG TAC TGG TAT CTG CAG AAA CCA GGG CAG AGT CCC CAA CTC CTG ATC TAC CAG ATG TCC AAC CTG GCA TCT GGC GTT CCT GAT CGG TTC TCA GGG TCA GGT TCT GGC ACT GAC TTC ACA CTG AAG ATC TCC AGG GTA GAG GCC GAA GAT GTC GGA GTG TAC TAT TGT GCC CAG AAT CTG GAG CTT CCA TGG ACC TTT GGA GGT GGC ACC AAA GTC GAG ATT AAG
61	5E7 L1	DVVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSSSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGKVEIK

[0902]

62	5E7 L1 DNA	GAT GTC GTG ATG ACC CAG AGT CCA CTG TCC CTT CCT GTC ACT CCT GGT GAA CCA GCC AGT ATT TCC TGT CGG TCA AGC AAA TCC CTC CTT CAC TCC AAC GGG ATT ACC TAT CTG TAC TGG TAT CTG CAG AAA CCC GGC CAA TCT CCC CAG TTG CTC ATC TAC CAG ATG AGC AAT CTG GCC TCT GGA GTA CCC GAC AGG TTC AGC TCT AGT GGA TCA GGG ACA GAC TTC ACA CTG AAG ATC AGC AGA GTG GAA GCT GAG GAT GTT GGC GTG TAC TAT TGC GCA CAG AAC CTG GAG TTG CCT TGG ACC TTT GGA GGT GGC ACT AAG GTG GAG ATA AAG
63	5E7 L2	DVVMTQSPLSNPVTGPGEPAISCRSSKSLLSHNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSSSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGKVEIK
64	5E7 L2 DNA	GAC GTC GTG ATG ACT CAG TCC CCT CTC TCT AAT CCC GTT ACT CCT GGA GAA CCA GCC AGC ATT TCC TGC AGA AGC AGC AAA TCC CTG CTG CAC AGT AAC GGC ATA ACC TAT CTG TAC TGG TAT CTG CAG AAA CCA GGG CAA AGT CCC CAG TTG CTG ATC TAC CAG ATG TCC AAC TTG GCT TCA GGT GTG CCT GAT CGG TTC AGT AGC TCT GGG TCT GGC ACA GAC TTC ACC CTG AAG ATC TCA AGG GTC GAA GCA GAG GAT GTA GGC GTG TAT TAC TGT GCC CAG AAT CTC GAG CTT CCC TGG ACC TTT GGA GGT GGA ACT AAG GTG GAG ATA AAG
65	5E7 L3	DVVMTQSALSNPVTGPGEPAISCRSSKSLLSHNGITYLY YWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSSSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGKVEIK
66	5E7 L3 DNA	GAT GTG GTC ATG ACT CAG TCT GCC TTG AGC AAT CCC GTA ACT CCA GGT GAA CCA GCC AGC ATA AGT TGT CGG TCA AGC AAG AGT CTC CTT CAC TCC AAT GGC ATT ACC TAT CTC TAC TGG TAT CTG CAG AAA CCT GGT CAG TCT CCC CAA CTG CTG ATC TAC CAG ATG AGC AAC CTG GCA AGT GGA GTC CCT GAC AGG TTC TCC TCC TCA GGA TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTG AAG ATC TCC AGA GTG GAA GCT GAG GAT GTT GGC GTG TAC TAT TGC GCT CAG AAC CTG GAG TTG CCC TGG ACC TTT GGC GGA GGG ACT AAG GTG GAG ATA AAG
67	5E7 HP FAB	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHW VKQRPQGLEWIGEIDPSDSYTNYNQKFKGKATLTLDK SSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCVRGYGNYGDYWGQGT TLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDK

[0903]

68	5E7 LP FAB	DVVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSHNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSSSGSGTDFT LRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
69	5E7 H0 FAB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHW VRQAPGQGLEWMGEIDPSDSTNYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARGYGNVGDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
70	5E7 L0 FAB	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLY YLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSSSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
71	接头 DGGFG	DGGFG
72	接头 DDGGFG	DDGGFG
73	接头 KDGGFG	KDGGFG
74	接头 GGFGGGF	GGFGGGF
75	接头 GGFGG	GGFGG
76	接头 GGFGGG	GGFGGG
77	全链 5E7 H5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYWMHW VKQRPQGLEWMGEIDPSDSTNYNQKFKGRVTMTL DKSTSTTYMESSLRSEDYAVYYCARGYGNVGDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
78	全链 5E7 L3	DVVMTQSALSNPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSSSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

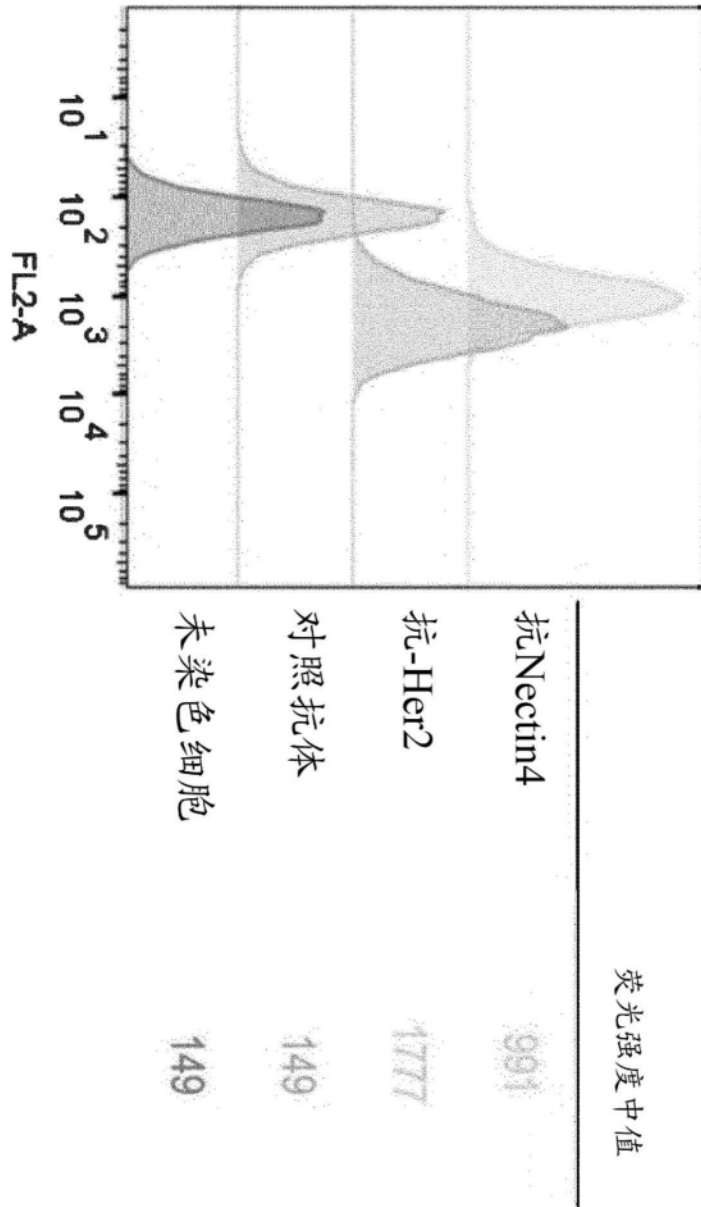


图1

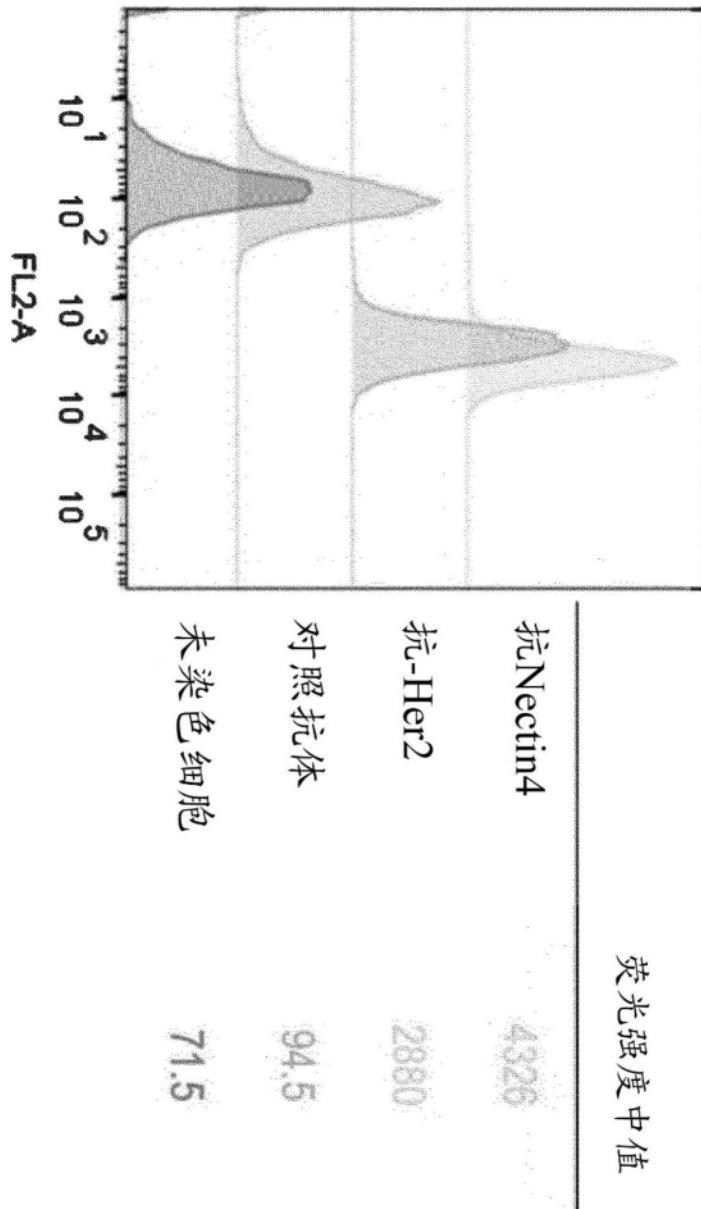


图2

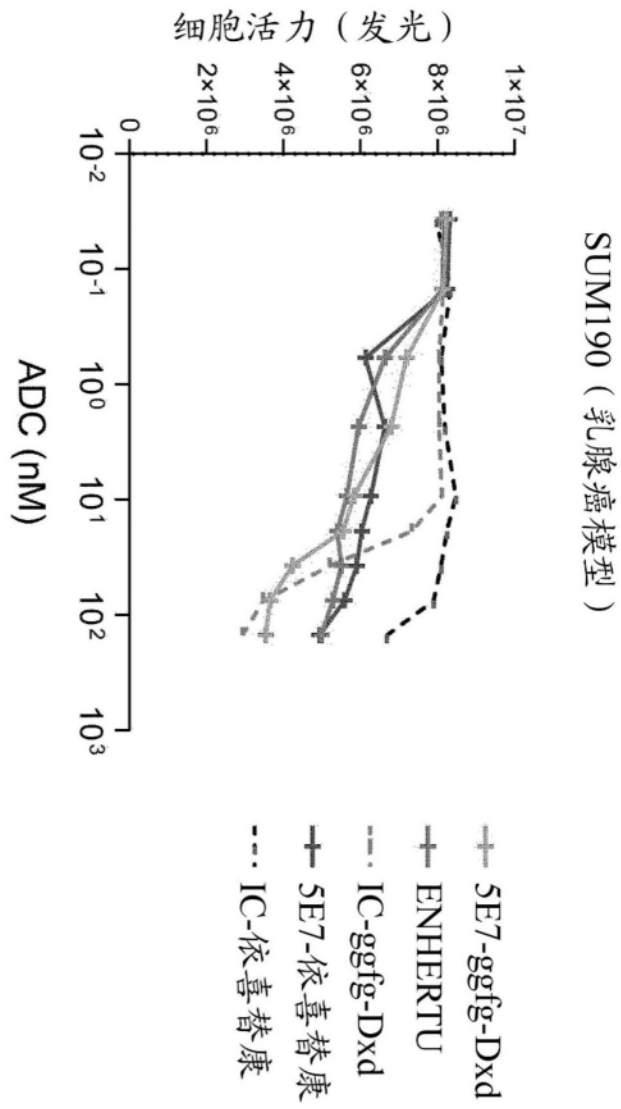
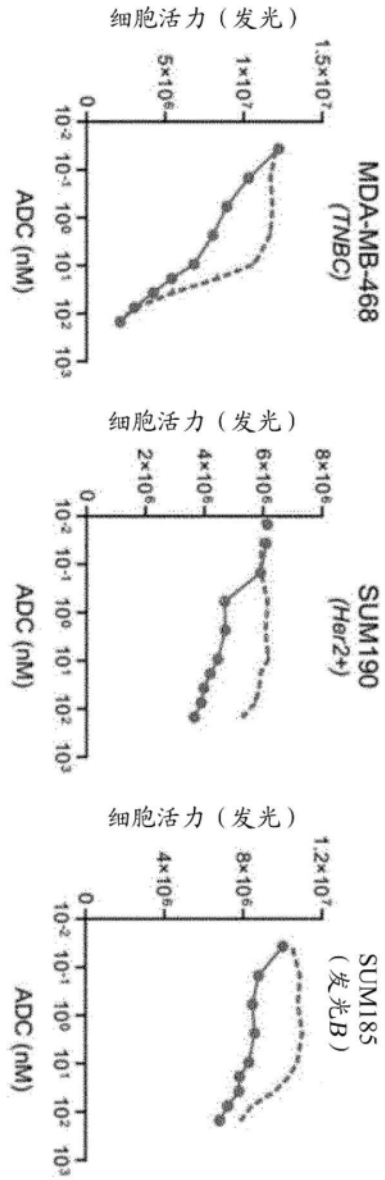
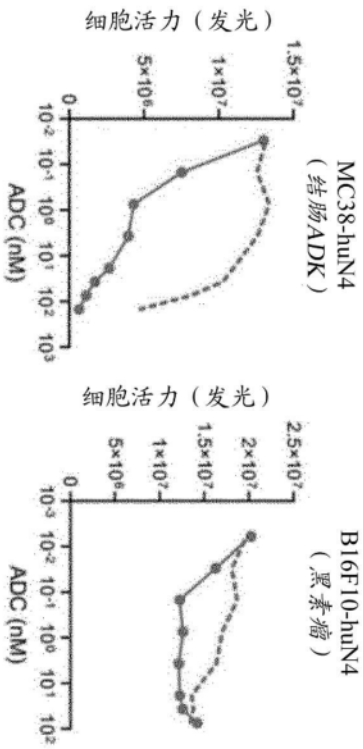


图3A

人乳腺癌模型
(人nectin-4的内源表达)



小鼠癌症模型
(转染的人nectin-4)



- - - IC-依喜替康
 -●- 5E7-依喜替康

图3B

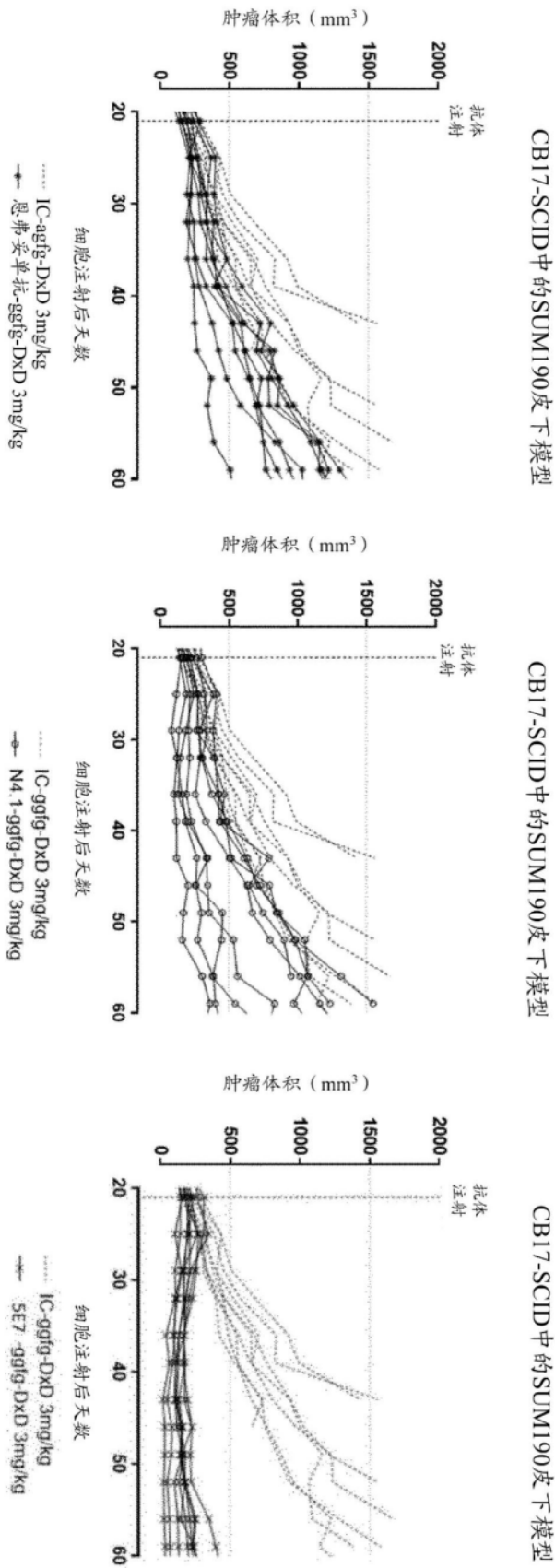


图4

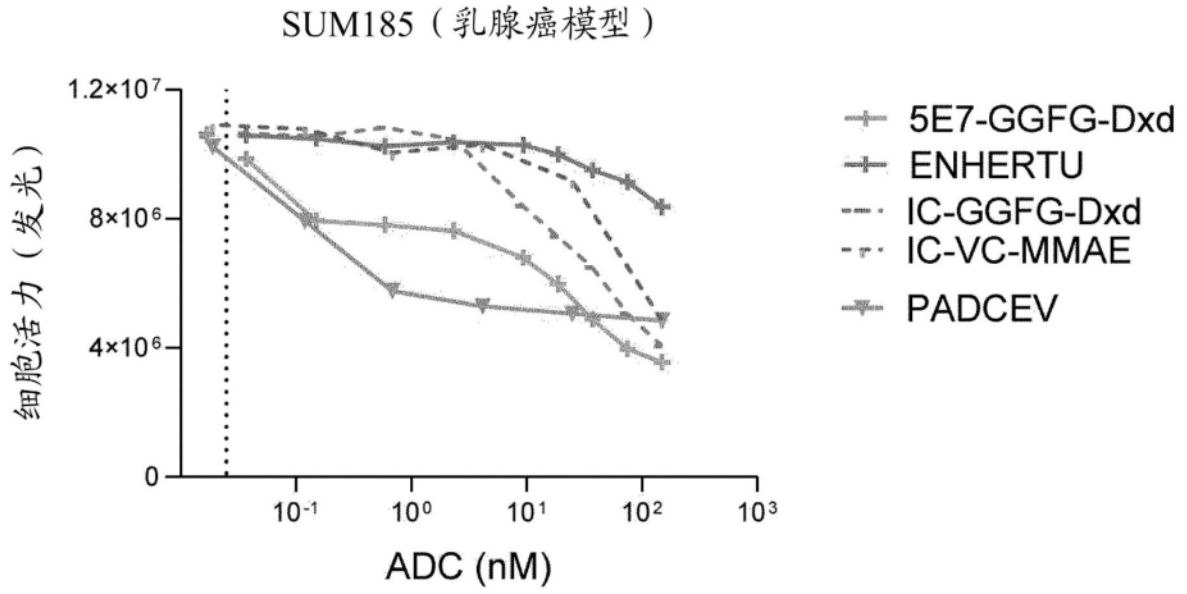


图5

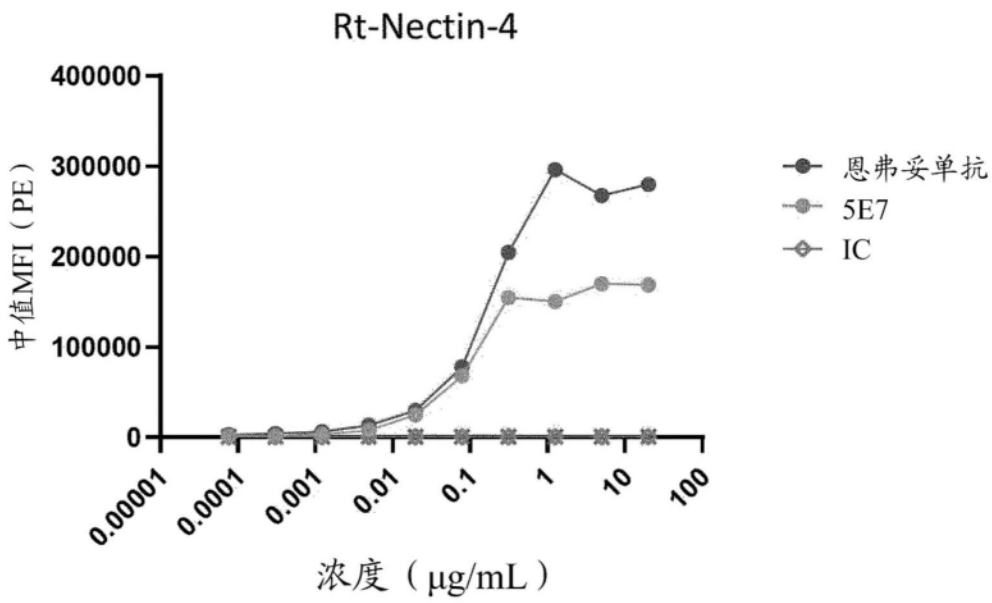


图6A

食蟹猴Nectin-4

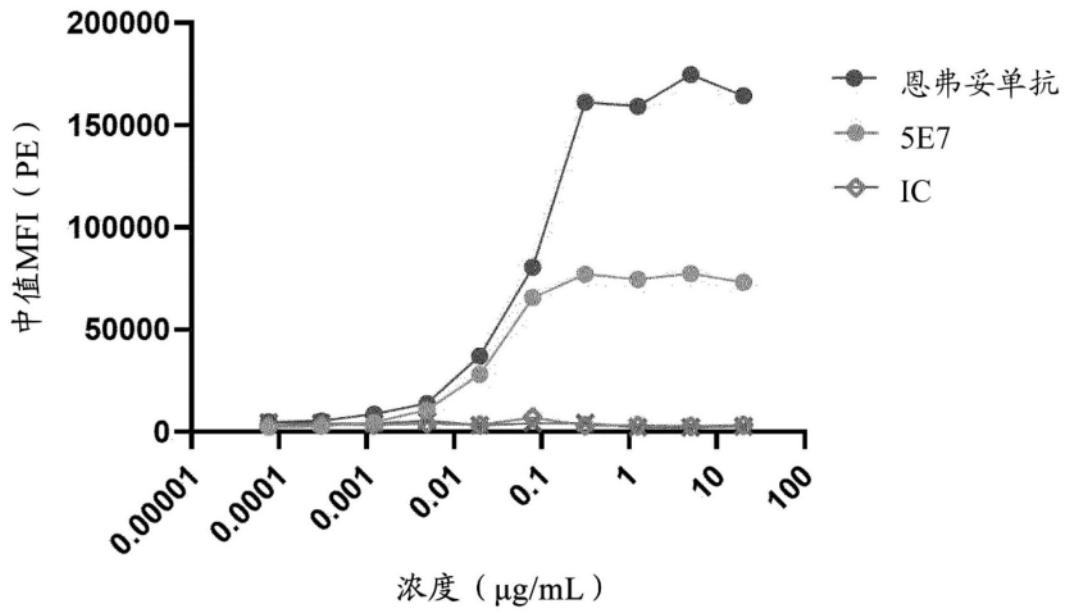


图6B

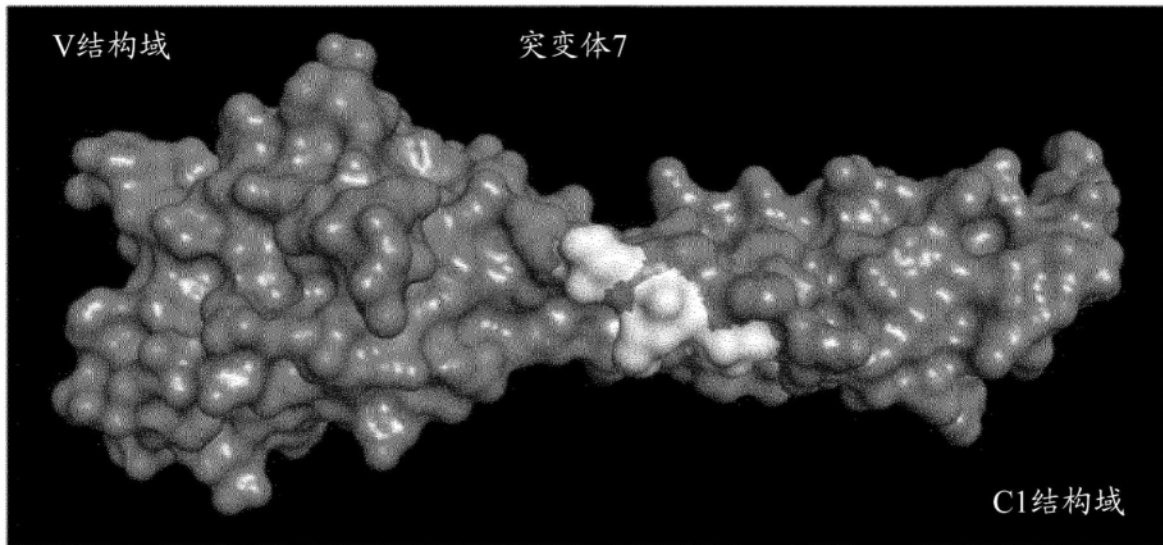


图7A

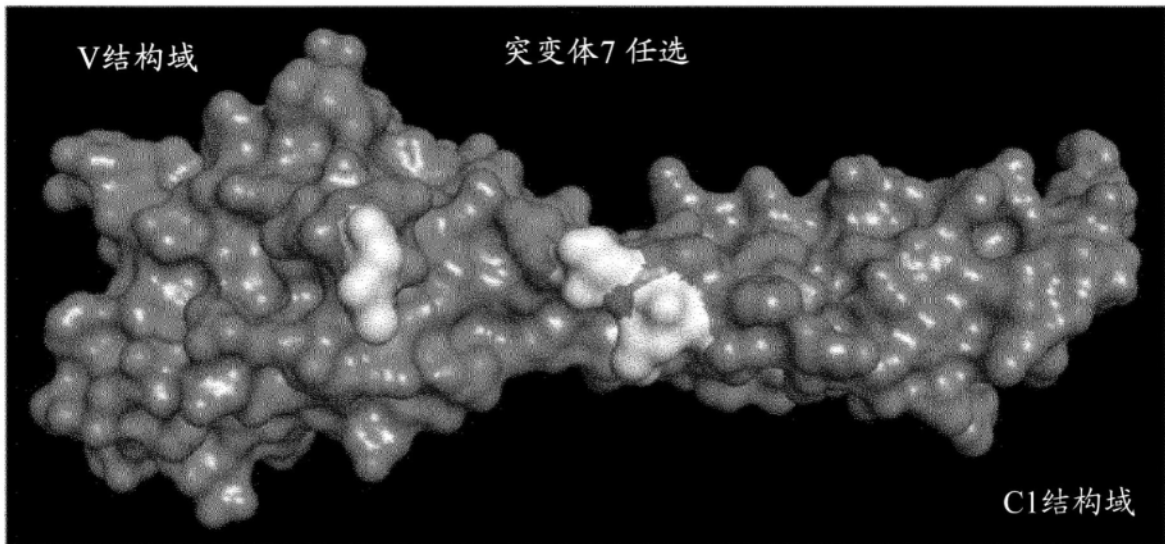


图7B

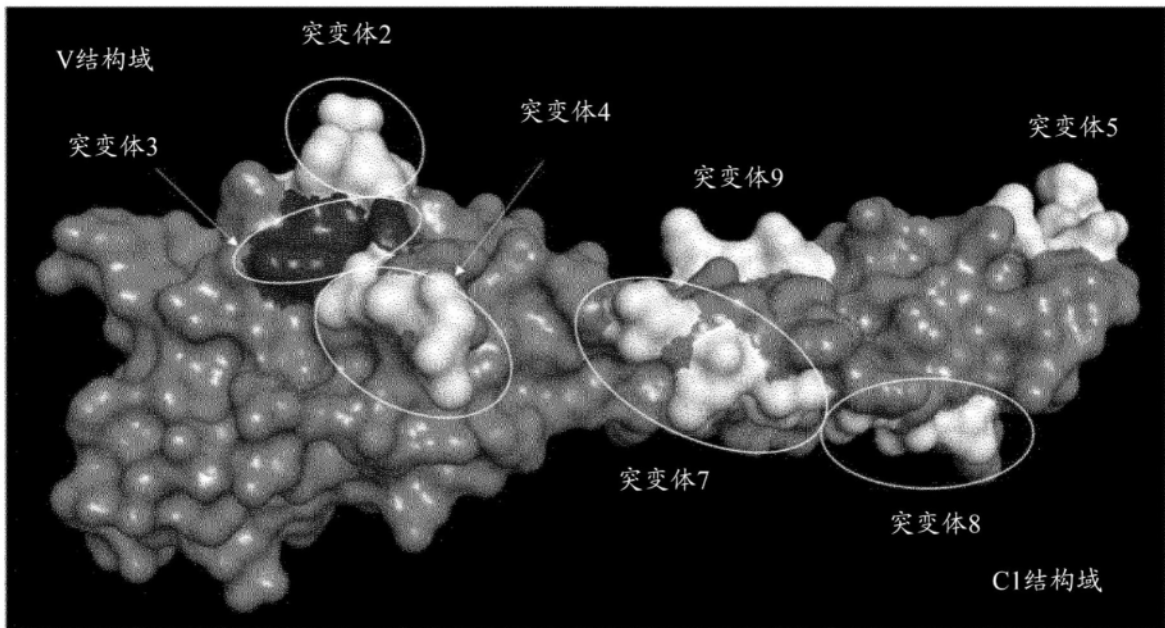


图8A

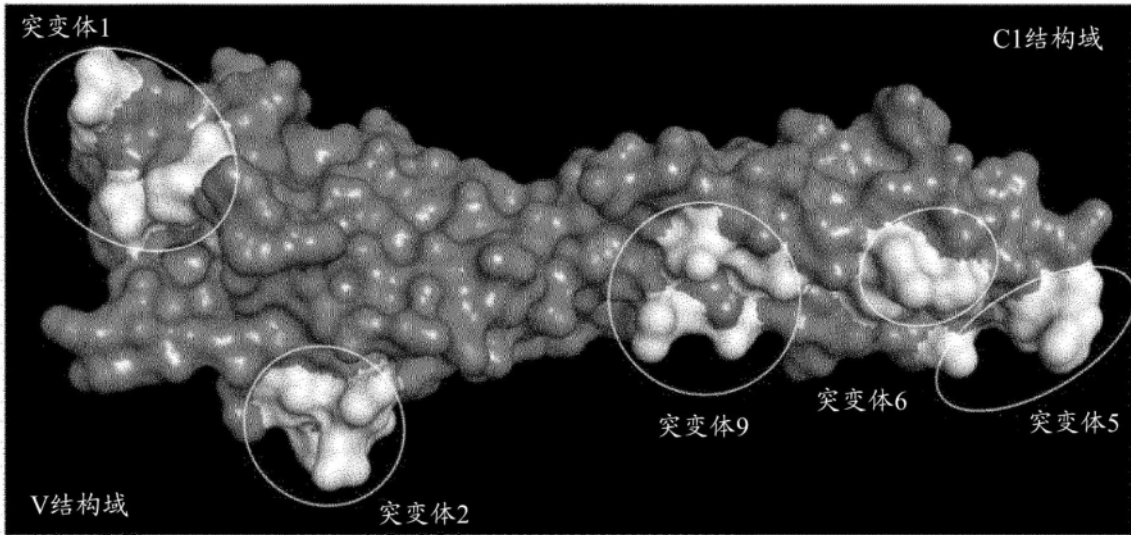


图8B

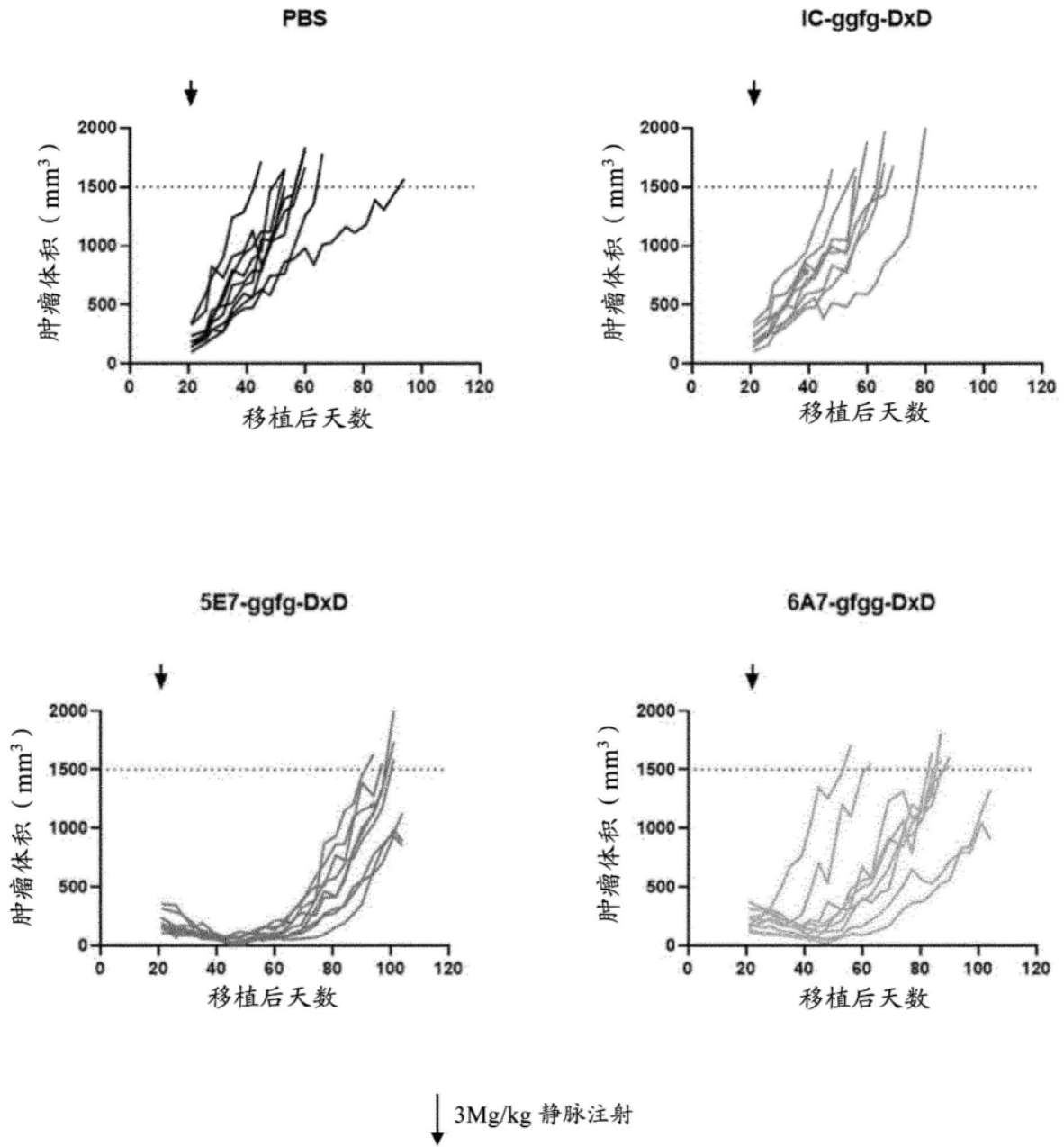


图9A

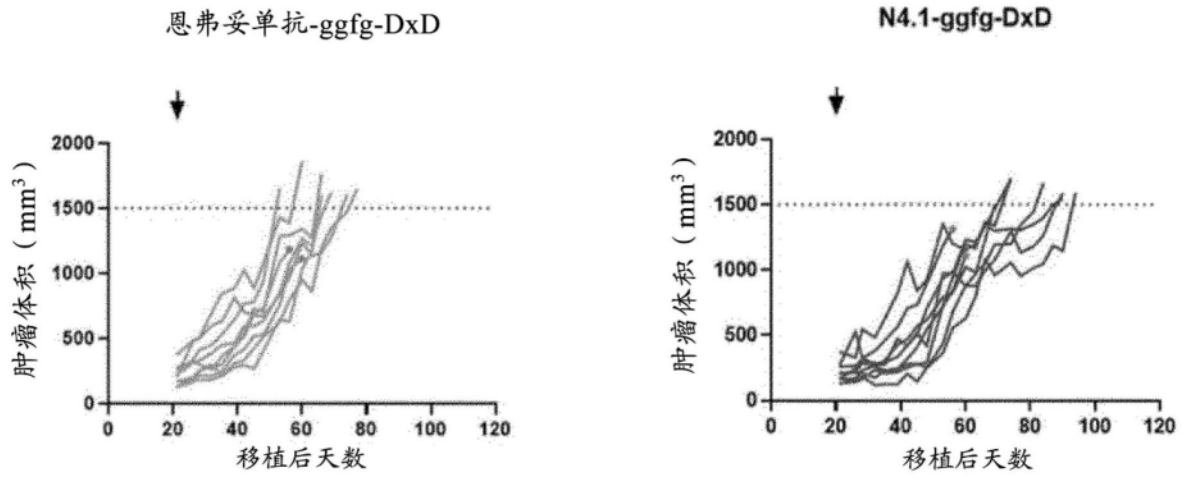


图9B

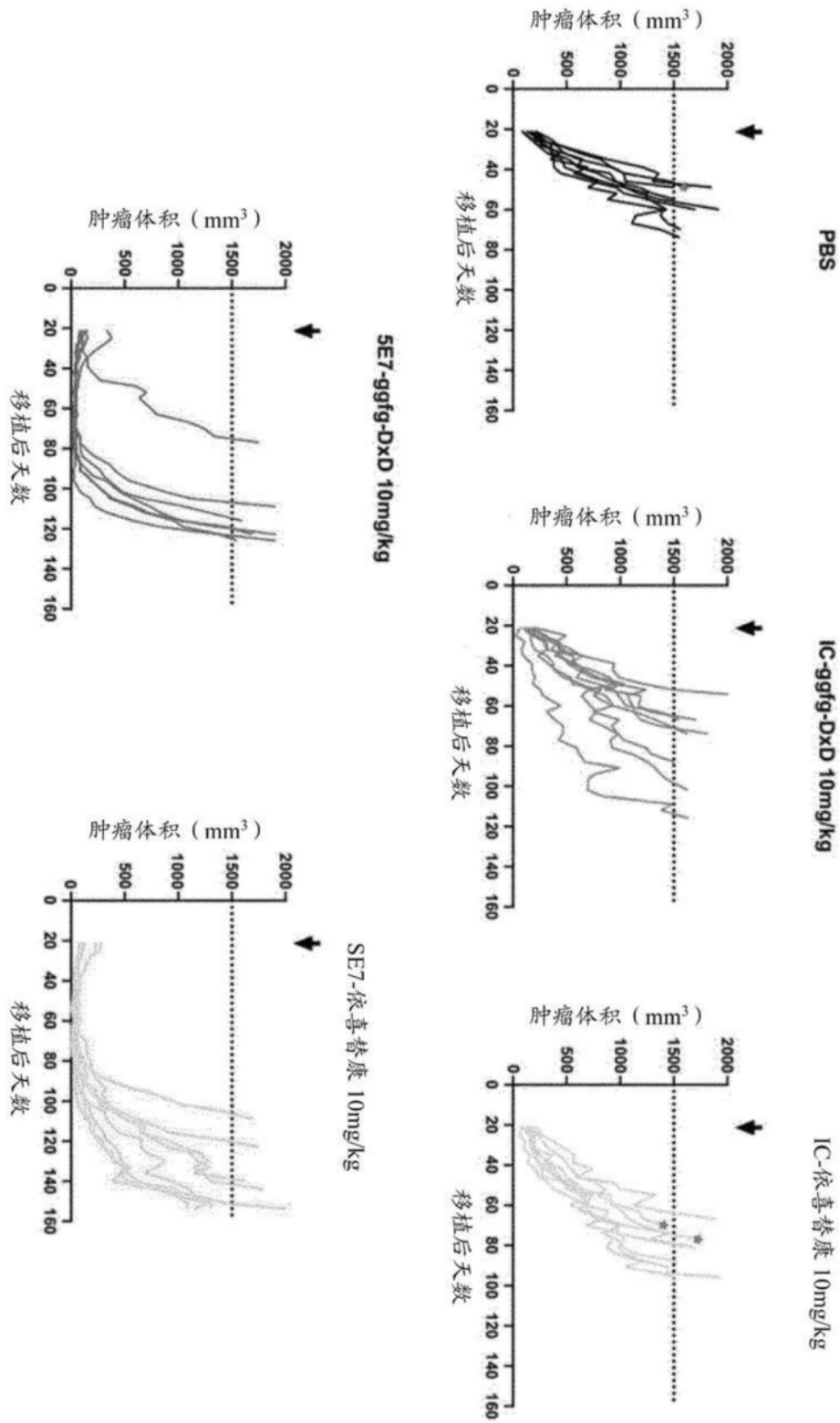


图9C

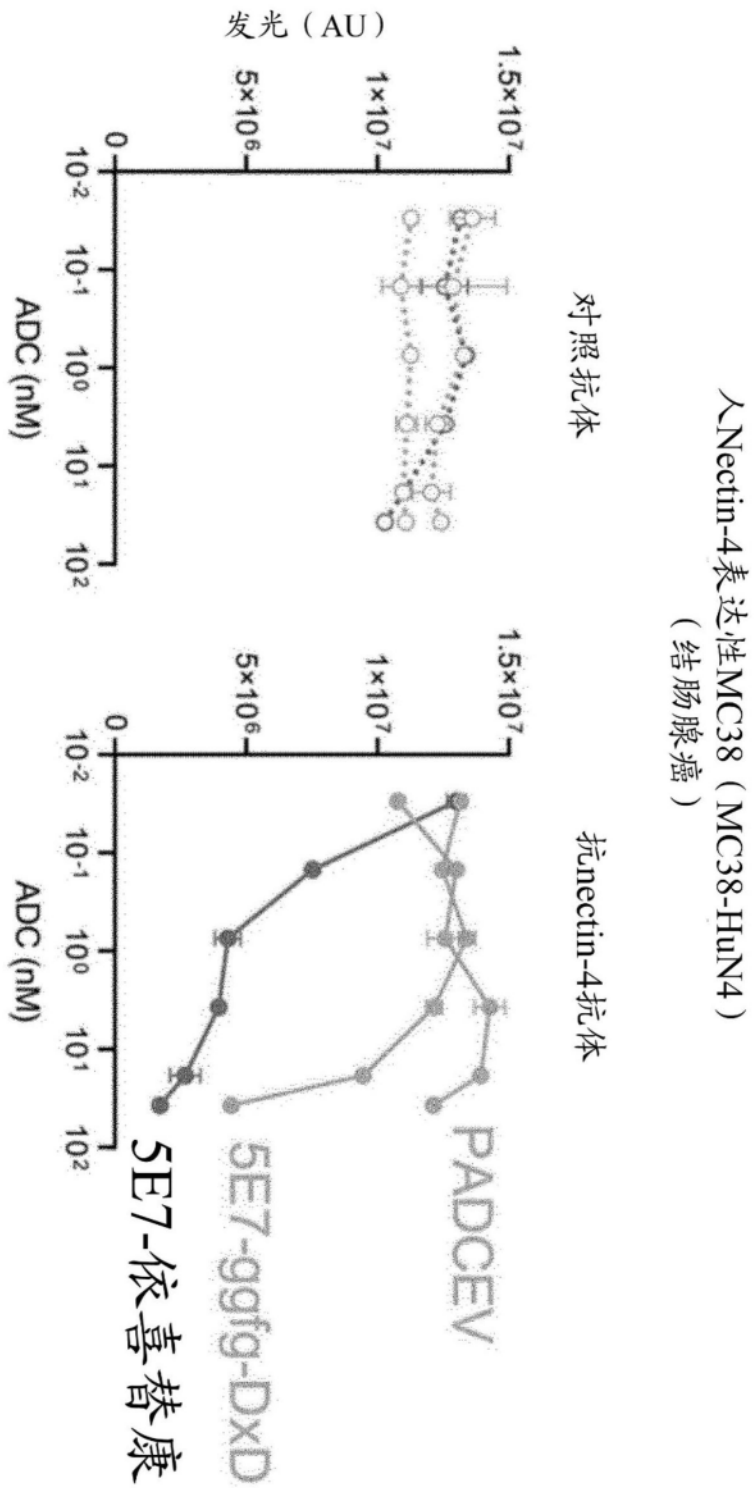


图10A

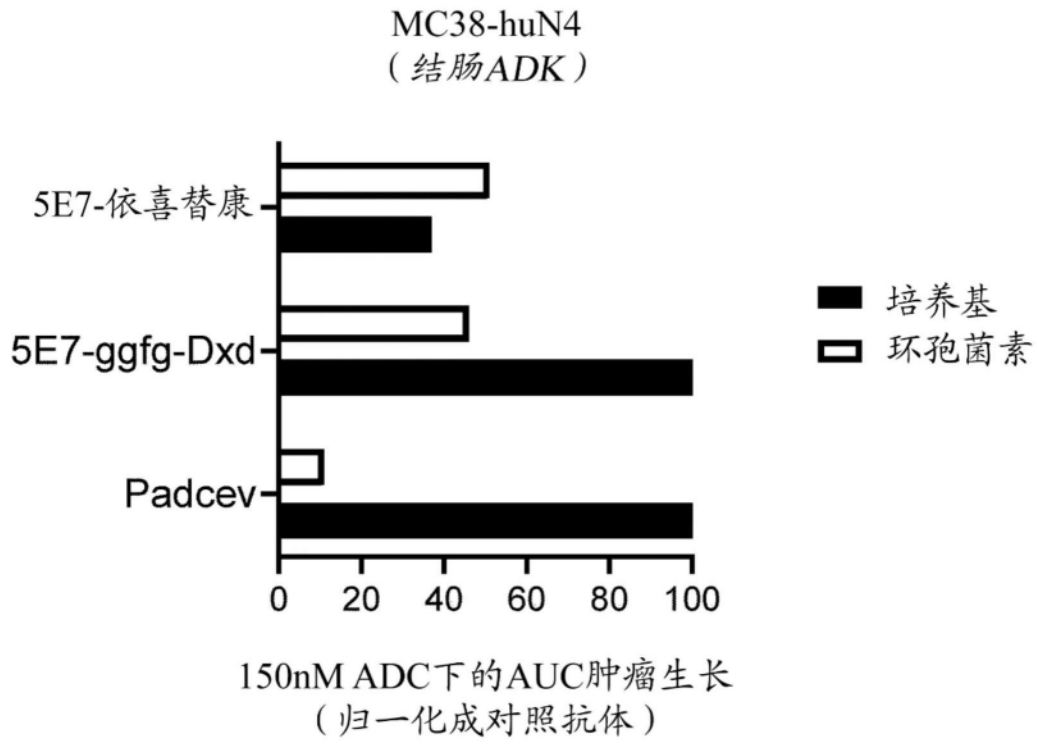


图10B

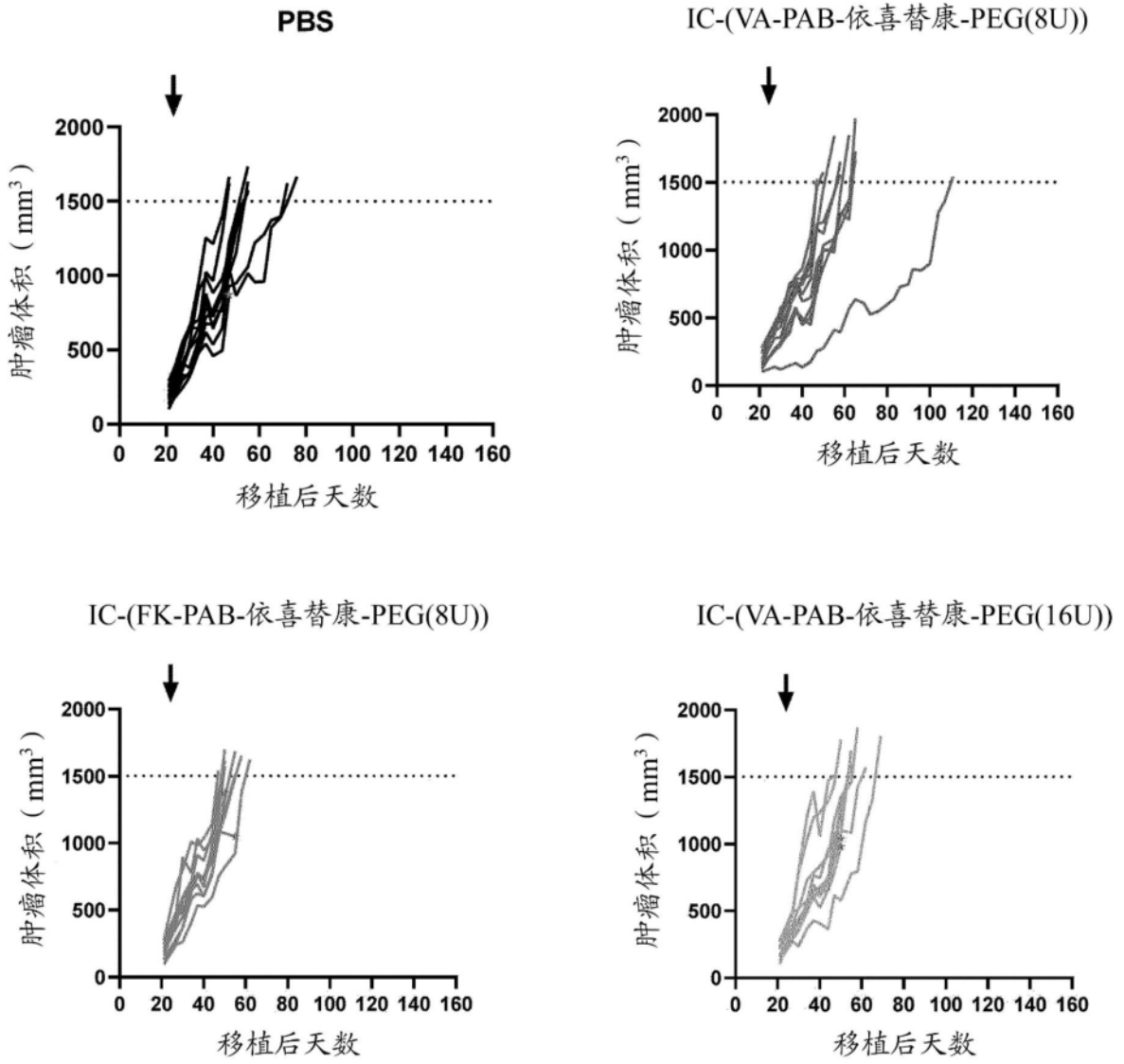


图11

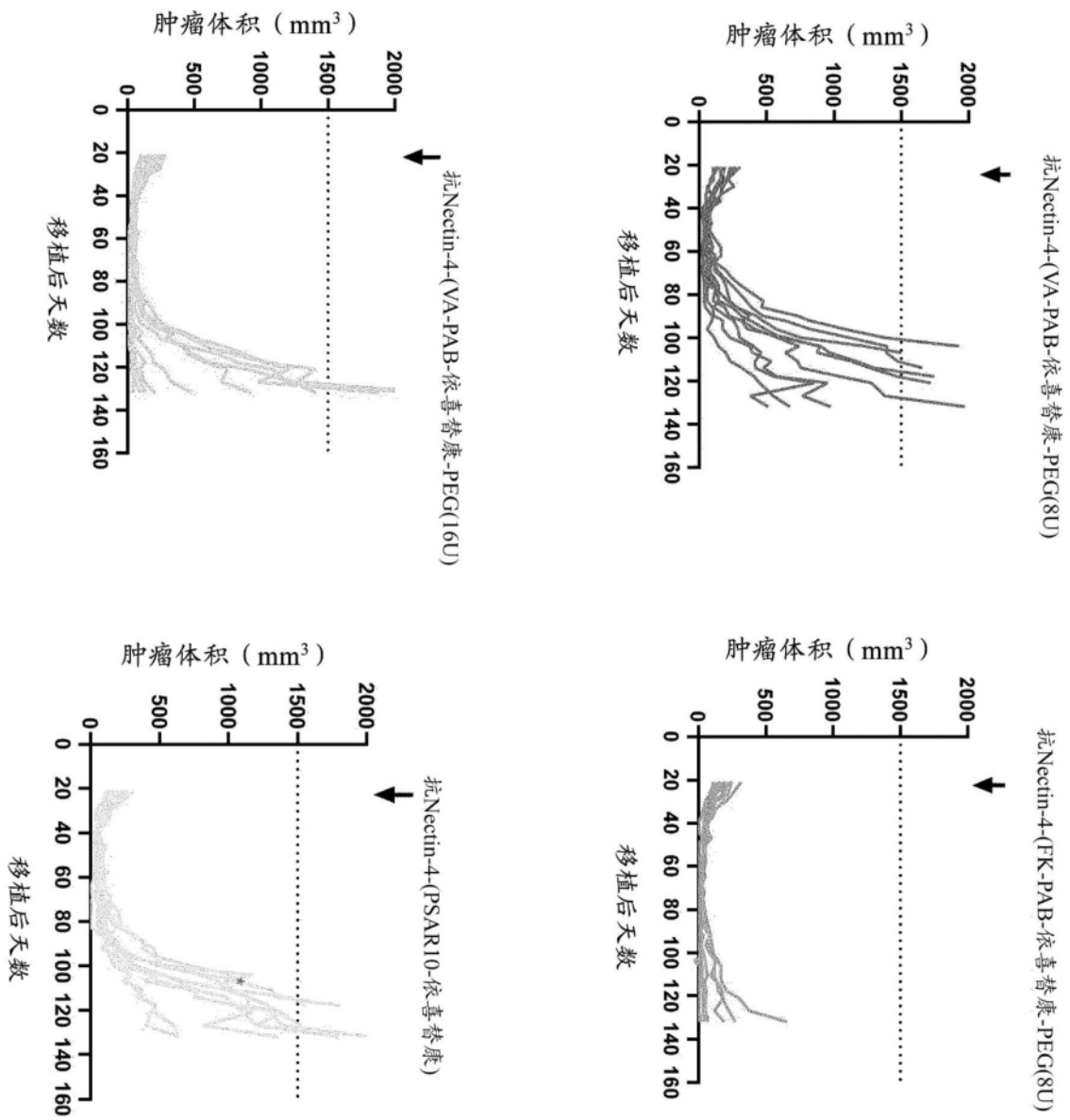


图12

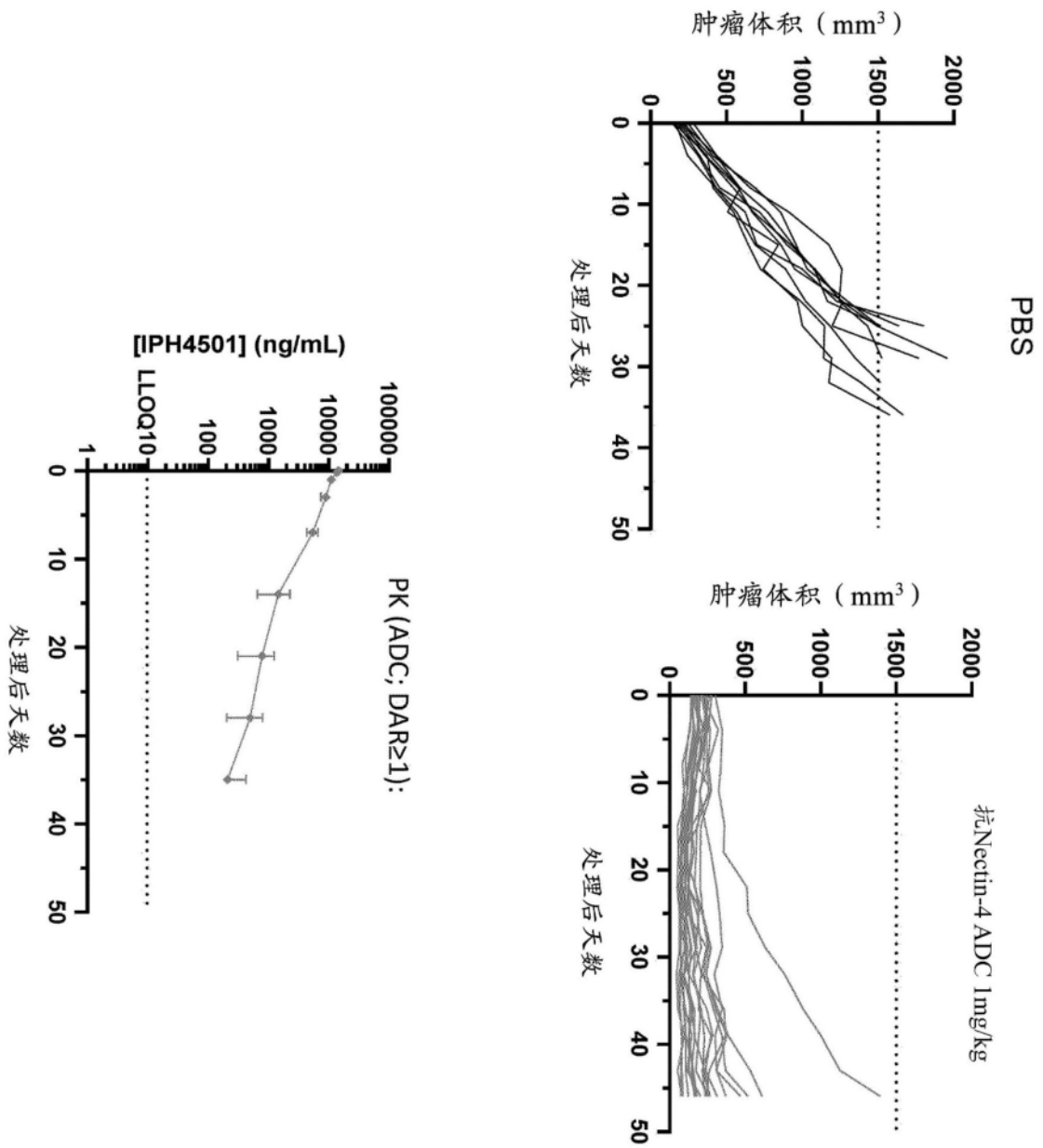


图13

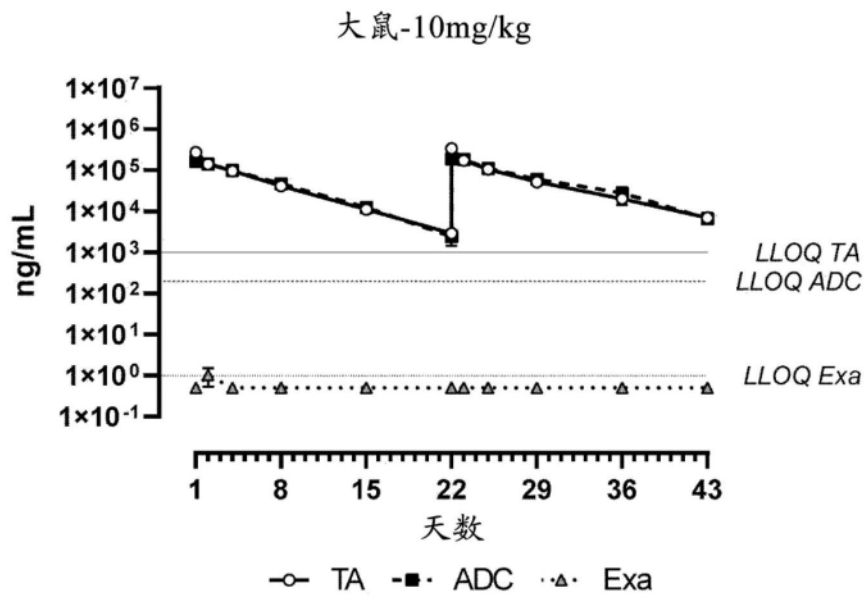
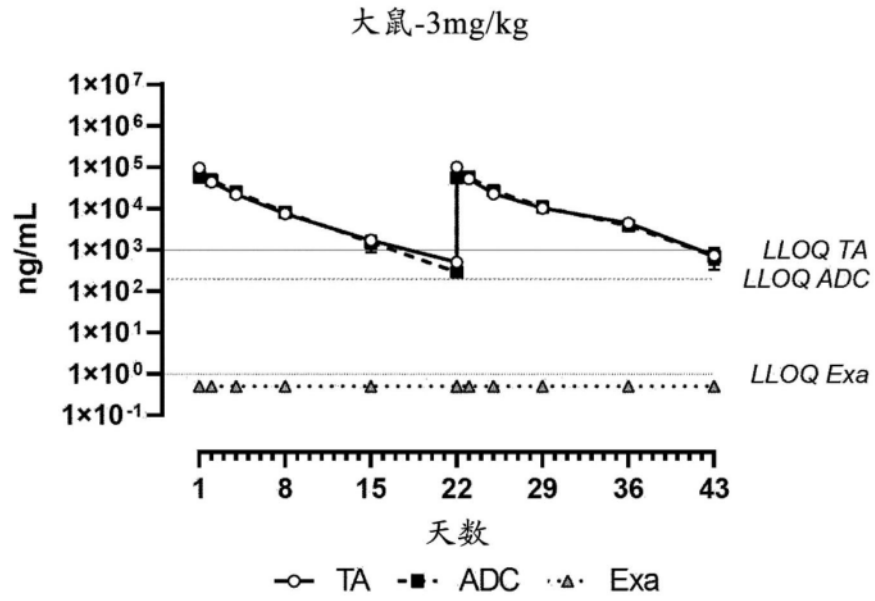


图14A

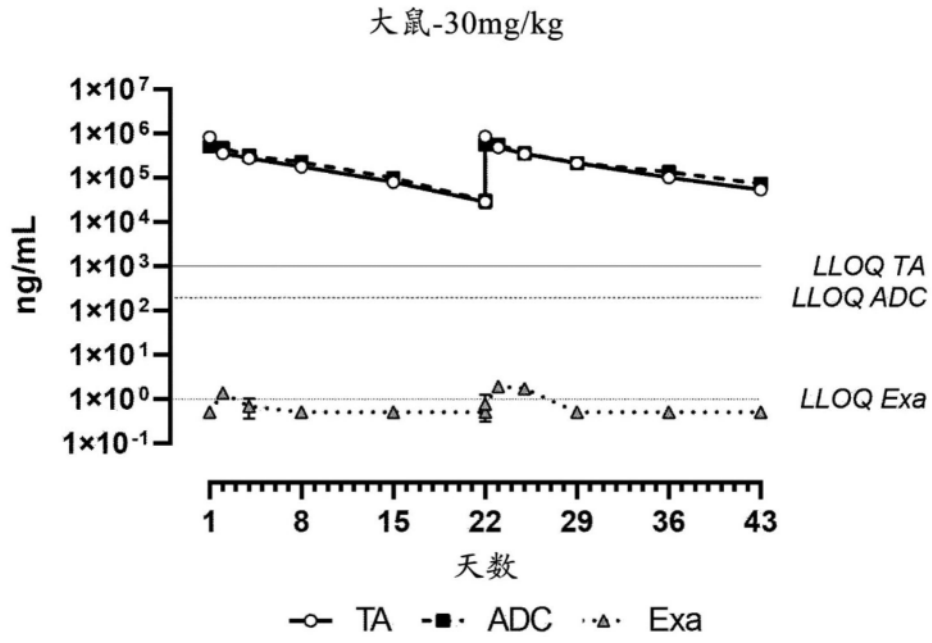


图14B

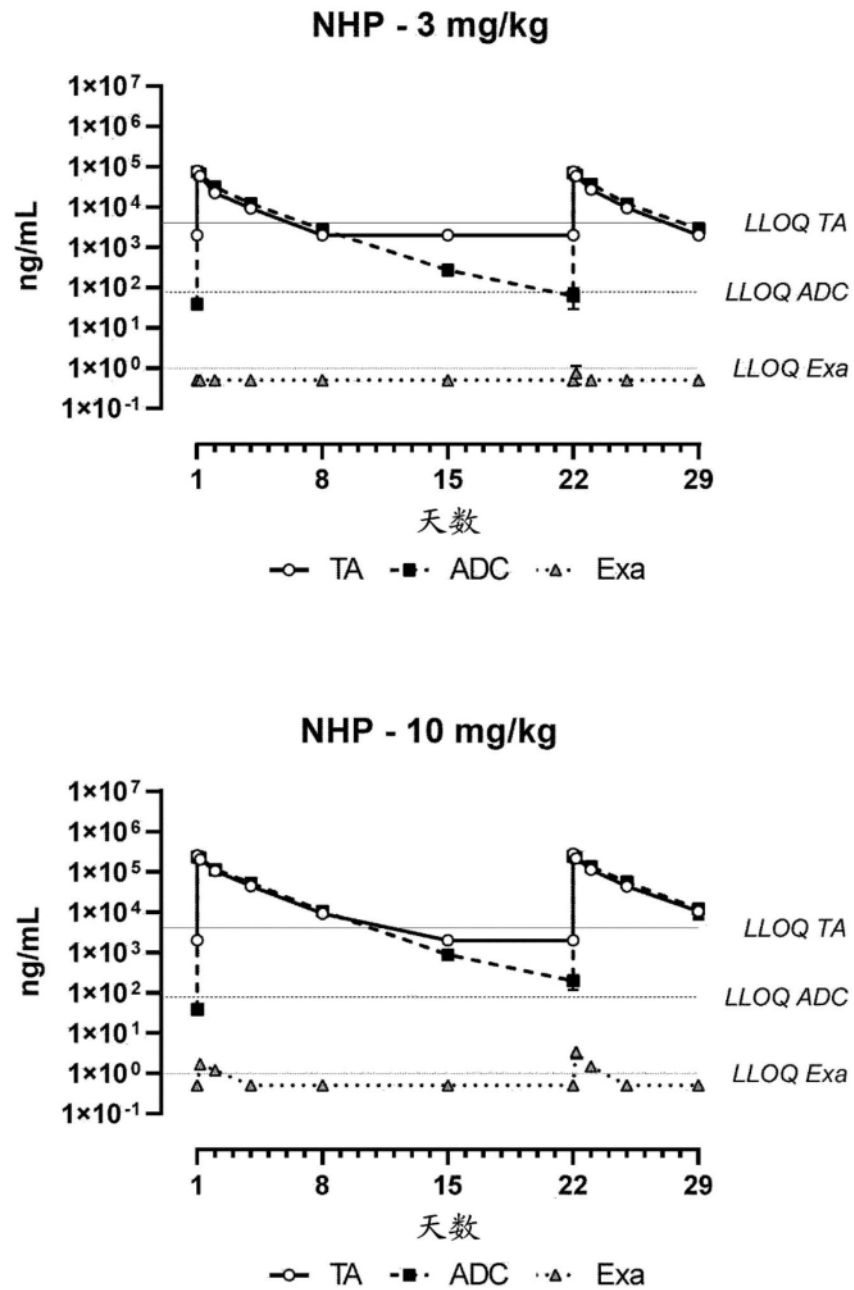


图15A

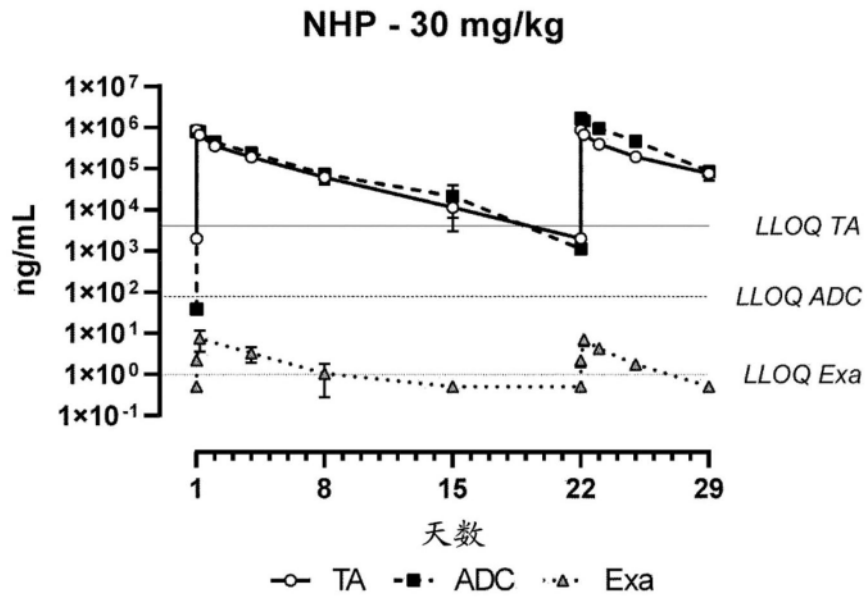


图15B