抗 FGFR2b 抗体、其抗体药物偶联物及其用途

技术领域

本发明涉及特异性结合成纤维细胞生长因子受体 2b (FGFR2b)抗体、抗体-药物偶联物和其使用方法，以及含有该分子的组合物。

背景技术

成纤维细胞生长因子(FGF)受体酪氨酸激酶(RTK)家族由成纤维细胞生长因子受体 1(FGFR1)、FGFR2、FGFR3 和 FGFR4 组成，并且涵盖多达 18 种不同 FGF 配体的高亲和力受体。受体是跨膜酪氨酸激酶，并且 FGFR 信号传导驱动的下游通路，包含对细胞增殖、分化、存活和迁移至关重要的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和 AKT 通路。FGF 配体与受体的结合诱导 FGF:FGFR 复合物的二聚化。二聚化导致受体的细胞质结构域中多个酪氨酸残基的激酶活化和自体磷酸化，以及磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)-AKT 和 MAPK 细胞外信号调节激酶(ERK)通路的下游信号传导的活化。FGFR1-3 中的 IgIII 环的替代剪接产生 FGFRIIIb 或 FGFRIIIc 同种型。

在各种癌症中已报道 FGFR2 扩增。FGFR2 扩增影响信号传导，而不改变受体的内源性激酶活性。FGFR2 蛋白在约 3%的乳腺癌中过表达，包含三阴性乳腺癌，以及约 10%的胃癌/食道癌。在其它癌症中也发现了 FGFR2 过表达，包含结肠癌、肝细胞癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、子宫内膜癌、膀胱癌、肺癌、结肠癌、神经胶质瘤和头颈癌。另外，已经在约 12%的子宫内膜癌中报道了 FGFR2 基因的突变。FGFR2 过表达已与胃癌患者的不良存活率相关。

临床前研究和临床研究两者证明 FGFR 扩增的肿瘤对 FGFR 抑制敏感并且因此对靶向治疗敏感。用如贝马里妥珠单抗(Bemarituzumab，即 FPA144)等抗 FGFR2 疗法治疗 FGFR2 阳性肿瘤据报道导致早期存活和晚期疾病的改善。“FPA144：用于治疗携带 FGFR2 基因扩增的胃癌患者的治疗性抗体(FPA144:A Therapeutic Antibody for Treating Patients with Gastric CancersBearing FGFR2 Gene Amplification)”(《美国癌症研究协会(AACR)》Abstract ID 5446)；Powers 等人(2016)“靶向 FGFR2b 受体的治疗性单克隆抗体 FPA144 可促进抗体依赖性细胞介导的细胞毒性并在 4T1 同系肿瘤模型中刺激对 PD-1 的敏感性(FPA144, A Therapeutic MonoclonalAntibody Targeting the FGFR2b Receptor, Promotes Antibody Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity and Stimulates Sensitivity to PD-1in the 4T1 SyngeneicTumor Model)”(《美国癌症研究协会》Abstract ID 1407)；Lee 等人(2016)“ADCC 增强的 FGFR2b 同种型选择性单克隆抗体 FPA144 在 FGFR2b+胃癌和晚期实体瘤患者中的抗肿瘤活性和安全性(Antitumor Activity and Safety of FPA144, an ADCC-Enhanced,FGFR2b Isoform-Selective Monoclonal Antibody,in Patients with FGFR2b+Gastric Cancer andAdvanced Solid Tumors)”(《美国临床肿瘤学会(ASCO)》Abstract ID 2502)。

对于在表达 FGFR2 的癌症中有效的改进的抗癌药物，仍然存在未满足的医学需求。

发明内容

本发明提供了新型抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段以及抗体药物偶联物，其具有针对人 FGFR2b 的高亲和力和高特异性等优势。本发明提供的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段和抗 FGFR2b 抗体药物偶联物可作为独立的疗法或与其他疗法/或其他抗癌药剂联合，用于诸如癌症/肿瘤的治疗。

第一方面，本发明涉及能够特异性结合 FGFR2b 的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，本发明提供了特异性结合 FGFR2b 的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段，其包含：

(1) 如 SEQ ID NO:7 所示的 VH 中含有的 3 个 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 或其变体；和/或，如 SEQ ID NO:8 所示的 VL 中含有的 3 个 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3) 或其变体；或，

(2) 如 SEQ ID NO:12 所示的 VH 中含有的 3 个 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 或其变体；和/或，如 SEQ ID NO:13 所示的 VL 中含有的 3 个 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3) 或其变体。

在一些实施方案中，本发明提供了特异性结合 FGFR2b 的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段，其包含：

1） 包含如 SEQ ID NO: 1 所示序列或由其组成的 HCDR1；
包含如 SEQ ID NO: 2 所示序列或由其组成的 HCDR2；
包含如 SEQ ID NO:3 所示序列或由其组成的 HCDR3；
包含如 SEQ ID NO:4 所示序列或由其组成的 LCDR1；
包含如 SEQ ID NO:5 所示序列或由其组成的 LCDR2；和
包含如 SEQ ID NO: 6 所示序列或由其组成的 LCDR3；或

2） 包含如 SEQ ID NO: 1 所示序列或由其组成的 HCDR1；
包含如 SEQ ID NO:2 所示序列或由其组成的 HCDR2；
包含如 SEQ ID NO: 11 所示序列或由其组成的 HCDR3；
包含如 SEQ ID NO: 4 所示序列或由其组成的 LCDR1；
包含如 SEQ ID NO: 5 所示序列或由其组成的 LCDR2；和
包含如 SEQ ID NO: 6 所示序列或由其组成的 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明提供了特异性结合 FGFR2b 的抗 FGFR2b 抗体及其抗原结合片段，其包含重链可变区（VH），其中：

(1) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:7 组成；或

(2) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:12 组成。

在一些实施方案中，本发明提供了特异性结合 FGFR2B 的抗 FGFR2B 抗体及其抗原结合片段，其包含轻链可变区（VL），其中：

(1) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:8 组成；或

(2) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:13 组成。

在另一些实施方案中，本发明提供了特异性结合 FGFR2b 的抗 FGFR2b 抗体及其抗原结合片段，其包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中：

(1) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:7 组成；所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:8 组成；或

(2) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:12 组成；所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由

SEQ ID NO:13 组成。

在一些实施方案中，上述抗体或其抗原结合片段还包含来自人抗体胚系共有序列的重链和/或轻链恒定区序列。所述的轻链恒定区优选是人源的κ或λ链恒定区。重链恒定区可以是γ、μ、α、δ、或ε链，在一些实施方案中，所述的重链恒定区优选来自人源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4的恒定区序列。在一些实施方案中，所述轻链恒定区包含SEQ ID NO：17所示的序列，或者由所述序列组成。在另一些实施方案中，所述重链恒定区包含SEQ ID NO：16所示的序列，或者由所述序列组成。

应当理解，也可以使用这些恒定区结构域的序列变体，例如包含一个或多个氨基酸修饰，其中氨基酸位点是应Kabat等人的 (1991) EU索引系统标识。

在一个具体实施方案中，本发明提供了特异性结合FGFR2b的抗FGFR2b抗体及其抗原结合片段，其包含重链和轻链，其中

1）所述重链包含如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列，或与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由SEQ ID NO:9组成；所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由SEQ ID NO:10组成；或

2）所述重链包含如SEQ ID NO:14所示氨基酸序列，或与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由SEQ ID NO:14组成；所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由SEQ ID NO:15组成。

第二方面，本发明提供一种如式(I)所述的抗 FGFR2b 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物：

Ab-(L-D)m [式(I)]

其中，

L为接头单元；

D为具有细胞毒性的小分子药物；

m为偶联于Ab的L-D单元的平均数，且m选自1~10，优选为2~8；

Ab为抗FGFR2b抗体或其抗原结合片段，其包含：

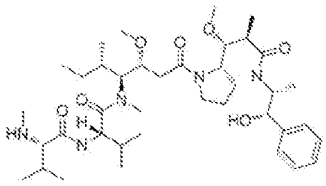
（1）重链可变区，包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:11所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3；和轻链可变区，SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

或

（2）重链可变区，包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3；和轻链可变区，SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

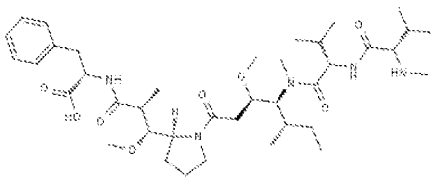
在一些实施方式中，本发明所述小分子药物D为单甲基澳瑞他汀类化合物、喜树碱类化合物或美登素类生物碱。

在一些实施方式中，所述单甲基澳瑞他汀类化合物可为单甲基澳瑞他汀 E (monomethyl auristatin E, MMAE)



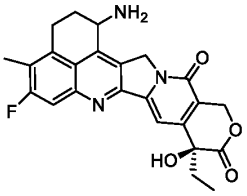
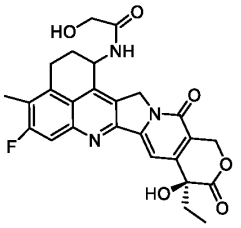
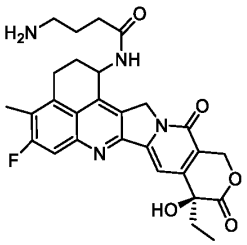
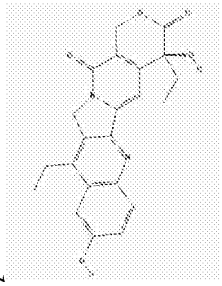
（MMAE）

或单甲基澳瑞他汀 F (monomethyl auristatin F, MMAF)



(MMAF)。

在一些实施方式中，所述的美登素类生物碱可为 DM1、DM3 或 DM4。

在一些实施方式中，所述喜树碱衍类化合物可为  (依喜替康)、 (Dxd(1))、 (Dxd(2)或(SN-38)。

在一些实施方式中，所述抗体药物偶联物包含多个 D 成分，所述多个 D 成分可以是不同治疗活性物质或药物活性成分的组合，或者是相同治疗活性物质或药物活性成分的组合。

在一些实施方式中，所述抗体药物偶联物具有 1-15 的药物/抗体比 (DAR)，例如数值为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 的 DAR。

在一些实施方式中，所述 DAR 为平均 DAR。

在一些实施方式中，平均 DAR 是 1-15，例如 1~10。

作为一种具体的实施方式，本发明所述的抗体药物偶联物平均 DAR 优选为 2~10，例如 2~8。

作为一种具体的实施方式，当 D 为喜树碱类化合物时，本发明所述的抗体药物偶联物的平均 DAR 优选为 2~8。

在一些实施方式中，细胞毒素以非位点特异性方式或者位点特异性方式借助接头与抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段共价连接。

本发明所用的“接头”、“接头单元”和“连接子”可互换使用。

本发明所用的“含药连接子”是指药物，如 D 所述的具有细胞毒性的小分子药物，与连接子直接或间接以共价键键合得到的化合物。

在一些实施方式中，所述 L 为一种或多种 L’的组合。

在一些实施方式中，所述 L’选自羰基、氨基、酰胺基、氨酰基、-$(PEG)_n$-、-$(CH_2)_n$-、含杂原子的-$(CH_2)_n$-、

-(C≡C)-、-(CH=CH)-、-O-、-S-、马来酰亚胺基（mc）、马来酰亚胺基丙酰基（MP）、甲基磺酰基嘧啶基、缬氨酸-瓜氨酸（val-cit）、缬氨酸-丙氨酸(val-ala)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸盐（SMCC）、丙氨酸-苯丙氨酸（ala-phe）、苯丙氨酸-赖氨酸(phe-lys)、对氨基苄氧羰基（PAB）、二甲基乙二胺（DMED）、N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶硫基)戊酸酯（SPP）、N-琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯（SMCC）、N-琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯（SIAB）、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯（SPDB）、N-琥珀酰亚胺基 3-(吡啶-2-基二硫代)-丙酸酯（SPDP）、甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸（GGFG）、乙酰基-赖氨酸-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基（AcLys-vc-PABC）。

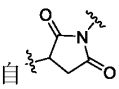
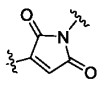
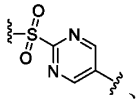
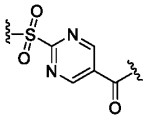
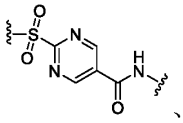
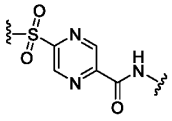
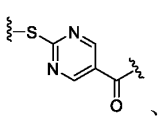
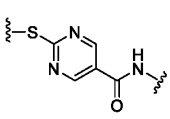
在一些实施方式中，所述 n 独立地选自 1~20 的整数。

作为一种具体的实施方式，当 L'选为$(PEG)_n$时，n 独立地优选为 2、4、6 或 8。

作为一种具体的实施方式，当 L'选为$(CH_2)_n$时，n 独立地优选为 1~16 中的整数。

作为一种具体的实施方式，当 L'选为含杂原子的$(CH_2)_n$时，n 独立地优选为 1~16 中的整数；所述的杂原子选自 N、O 或 S。且杂原子的个数独立地优选为 1~8 中的整数。

在一些实施方式中，所述的 L 可为 J-L_1-L_2-X-L_3。

在一些实施方式中，所述的 J 选自、、、、、、、。

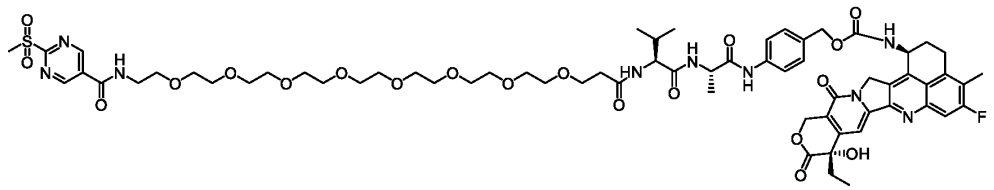
在一些实施方式中，L_1选自单键、-$(PEG)_n$-或-$(CH_2)_n$-，所述的-$(CH_2)_n$-可任选地含有 1~6 个选自 N、O、S 的杂原子；其中 n 独立地选自 1~20 中的整数。优选地，L_1选自-$(PEG)_n$-，其中 n 独立地为 2、4、6 或 8。

在一些实施方式中，L_2 选自单键、-O-、-S-、-CH_2-、-NH-、-C(O)-中的一个或多个的组合；其中所述的-CH_2-和-NH-可任选地被$C_{1\sim6}$烷基或卤素取代 1~3 次。

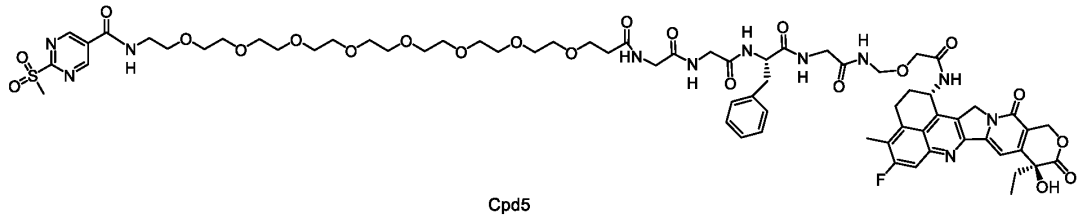
在一些实施方式中，X 选自单键或 1~4 个 X'的组合，所述的 X'独立地选自氨基酸，例如甘氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、赖氨酸和瓜氨酸。在一些实施方式中，X 选自单键或缬氨酸-瓜氨酸（val-cit）、缬氨酸-丙氨酸(val-ala)、丙氨酸-苯丙氨酸（ala-phe）、苯丙氨酸-赖氨酸(phe-lys)、甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸（GGFG）。

在一些实施方式中，L_3 选自单键、-O-、-S-、-CH_2-、-NH-、-C(O)-、-苯基-、-环丙基-、-环丁基-、-环己基-中的一个或多个的组合；其中所述的-CH_2-、-NH-、-苯基-、-环丙基-、-环丁基-、-环己基-可任选地被$C_{1\sim6}$烷基、卤素、氰基或羟基取代 1~3 次。

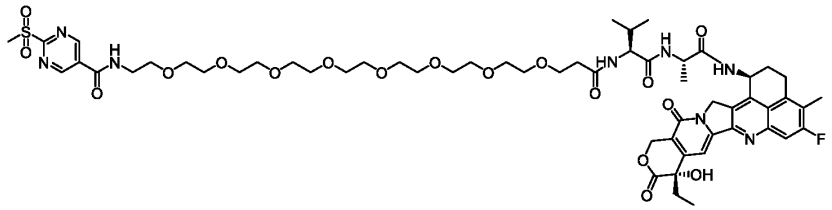
在另一个方面，本发明提供三种式（L-D）的接头单元-细胞毒性小分子药物，如式 Cpd3、式 Cpd5 及式 Cpd6 所示：



Cpd3、



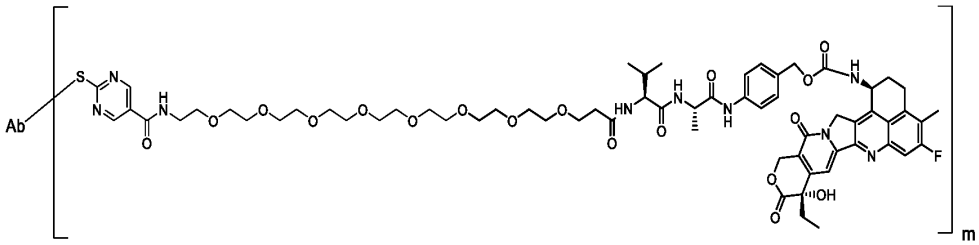
Cpd5



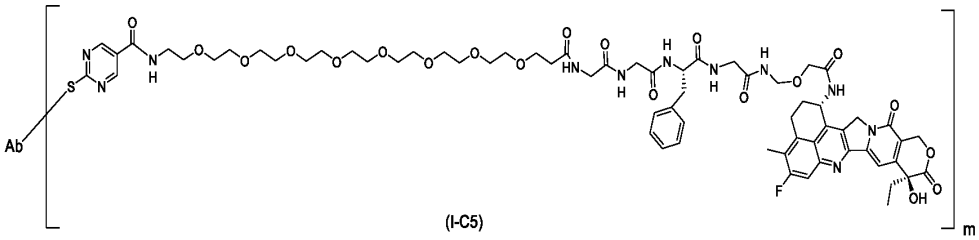
Cpd6

在一些实施方式中，本发明所提供的如式 Cpd3、式 Cpd5 及式 Cpd6 所示接头-毒素适用于偶联抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段。

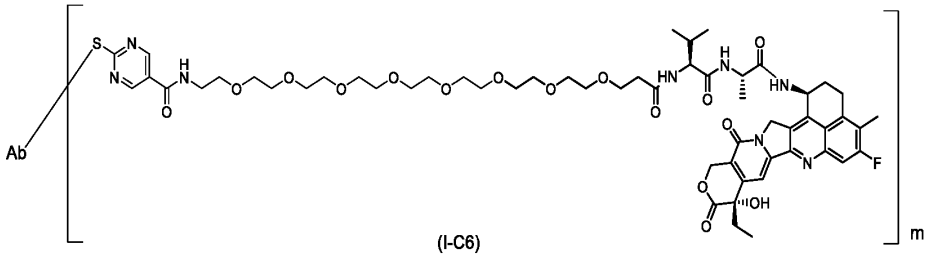
进一步地，本发明提供了抗 FGFR2b 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中所述抗 FGFR2b 抗体药物偶联物结构如式(I-C3)、式(I-C5)及式(I-C6)所示：



(I-C3)



(I-C5)



(I-C6)

其中，

m 为平均连接数，且 m 独立地选自 1~10；

Ab 为抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含氨基酸序列分别如：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:11 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；所

述轻链可变区包含 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

或

其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 所述。

在一些实施方式中，本发明所述抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段包含：氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%同一性的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%同一性的轻链可变区。

在一些实施方式中，本发明所述抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段包含：氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%同一性的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%同一性的轻链可变区。

在一些实施方式中，本发明所述抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段包含：氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%同一性的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%同一性的轻链。

在一些实施方式中，本发明所述抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段包含：氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%同一性的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%同一性的轻链。

在一些实施方式中，本发明所述抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段包含：氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区。

在一些实施方式中，本发明所述抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段包含：氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示的轻链可变区。

在一些实施方式中，本发明所述抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段包含：氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示的轻链。

在一些实施方式中，本发明所述抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段包含：氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示的轻链。

在一些实施方式中，本发明所述抗体或抗原结合片段为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。

作为一种具体的实施方式，本发明所述 SEQ ID:12 片段为人源化抗体。

作为一种具体的实施方式，本发明所述 SEQ ID:13 片段为人源化抗体。

作为一种具体的实施方式，本发明所述 SEQ ID:14 片段为人源化抗体。

作为一种具体的实施方式，本发明所述 SEQ ID:15 片段为人源化抗体。

在一些实施方式中，本发明所述抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段为 Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')2 或 sdAb。

在一些实施方式中，本发明所述抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段为任何 IgG 亚型，如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4；优选地，所述抗体是低或无岩藻糖基化的。

在一些实施方式中，本发明所述 Ab 包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方式中，本发明所述 Ab 包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方式中，本发明所述 Ab 包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR）和 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR）。

在一些实施方式中，Ab 包含重链可变区（VH）。

在一些实施方式中，所述重链可变区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR）。

在一些实施方式中，Ab 包含轻链可变区（VL）。

在一些实施方式中，所述轻链可变区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR）。

在一些实施方式中，Ab 包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）。

在一些实施方式中，本发明所述重链可变区：

（i）包含与 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

（ii）包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

（iii）包含与 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列相比具有一个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸序列改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方式中，本发明所述重链可变区：

（i）包含与 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

（ii）包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

（iii）包含与 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列相比具有一个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸序列改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方式中，本发明所述轻链可变区：

（i）包含与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

（ii）包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

（iii）包含与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列相比具有一个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸序列改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方式中，本发明所述轻链可变区：

（i）包含与 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

（ii）包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

（iii）包含与 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列相比具有一个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸序列改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方式中，本发明的 3 个 VH 的互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 为：

（i）如 SEQ ID NO:7 所示的 VH 中所含的三个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；或

（ii）相对于（i）的序列，所述单个 HCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的序列。

在一些实施方式中，本发明的 3 个 VH 的互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 为：

（i）如 SEQ ID NO:12 所示的 VH 中所含的三个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；或

（ii）相对于（i）的序列，所述单个 HCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的序列。

在一些实施方式中，本发明的 3 个 VL 的互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为：

（i）如 SEQ ID NO:8 所示的 VL 中所含的三个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

（ii）相对于（i）的序列，所述单个 LCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的序列。

在一些实施方式中，本发明的 3 个 VL 的互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为：

（i）如 SEQ ID NO:13 所示的 VL 中所含的三个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

（ii）相对于（i）的序列，所述单个 LCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的序列。

在一些实施方式中，HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR1 包含与 SEQ ID NO:1 的序列相比有一个、两个或三个改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列。

在一些实施方式中，HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR2 包含与 SEQ ID NO:2 的序列相比有一个、两个或三个改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列。

在一些实施方式中，HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR3 包含与 SEQ ID NO:3 的序列相比有一个、两个或三个改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列。

在一些实施方式中，LCDR1 包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR1 包含与 SEQ ID NO:4 的序列相比有一个、两个或三个改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列。

在一些实施方式中，LCDR2 包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR2 包含与 SEQ ID NO:5 的序列相比有一个、两个或三个改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列。

在一些实施方式中，LCDR3 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR3 包含与 SEQ ID NO:6 的序列相比有一个、两个或三个改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列。

在一些实施方式中，HCDR3 包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR3 包含与 SEQ ID NO:11 的序列相比有一个、两个或三个改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述 Ab 包含重链恒定区。

在一些实施方式中，本发明所述 Ab 包含轻链恒定区。

在一些实施方式中，本发明所述 Ab 包含重链恒定区和轻链恒定区。

在一些实施方式中，所述重链恒定区为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区。

在一些实施方式中，本发明重链

（i）包含与 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

（ii）包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

（iii）包含与 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列相比具有一个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方式中，本发明重链

（i）包含与 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

（ii）包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

（iii）包含与 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列相比具有一个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方式中，本发明轻链

（i）包含与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

（ii）包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

（iii）包含与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列相比具有一个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方式中，本发明所述 Ab 特异性结合 FGFR2b，包含如 SEQ ID NO:7 所示的 VH 中所含的三个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和/或如 SEQ ID NO:8 所示的 VL 中所含的三个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR2。

在一些实施方式中，本发明轻链

（i）包含与 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

（ii）包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

（iii）包含与 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列相比具有一个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方式中，本发明所述 Ab 特异性结合 FGFR2b，包含如 SEQ ID NO:7 所示的 VH 中所含的三个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和/或如 SEQ ID NO:8 所示的 VL 中所含的三个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR2。

在一些实施方式中，本发明所述 Ab 特异性结合 FGFR2b，包含如 SEQ ID NO:12 所示的 VH 中所含的三个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和/或如 SEQ ID NO:13 所示的 VL 中所含的三个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR2。

在一些实施方式中，本发明所述 Ab 包含

VH，其包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或

VL，其包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方式中，本发明所述 Ab 包含

VH，其包含 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或

VL，其包含 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

本发明提供了靶向人 FGFR2b 的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，所述抗体药物偶联物具有以下优点：

（1）结合表达人 FGFR2b 的靶细胞，与其具有高亲和力；

（2）通过内吞作用进入细胞，杀伤靶细胞；在一些实施方案中，本发明的 ADC 具有高内吞效率；

（3）治疗、预防、改善受试者与 FGFR2b 异常功能或表达相关的病症 (例如癌症)，或治疗、预防、改善所述疾病的一或多种症状；

（4）减少或抑制受试者 (其具有表达 FGFR2b 的肿瘤) 中肿瘤生长或进展；

（5）诱导表达 FGFR2b 的肿瘤消退 (例如长期消退)；

（6）在表达 FGFR2b 的细胞中发挥细胞毒性活性；

第三方面本发明提供了分离的多核苷酸分子，其编码第一方面所述的任一抗体或其抗原结合片段。

第四方面，本发明提供了载体，其包含第三方面的核酸分子。在一些实施方案中，所述载体是表达载体。

第五方面，本发明提供了宿主细胞，其包含第四方面的载体或第三方面的核酸分子。在一些实施方案中，该宿主细胞是原核的，例如大肠杆菌。在其它实施方案中，该宿主细胞是真核的，例如 HEK293 细胞，CHO 细胞，酵母细胞，或植物细胞。

第六方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含第一方面所述的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段；或第二方面所述的抗 FGFR2b 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，和药学上可接受的赋形剂。

第七方面，本发明提供了第一方面所述的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段；或第二方面所述的抗 FGFR2b 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物；或第六方面所述的药物组合物在制备用于治疗和/或预防 FGFR2b 介导的疾病或病症的药物中的用途。

一个实施方案中，本发明提供了第一方面所述的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段；或第二方面所述的抗 FGFR2b 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物；或第六方面所述的药物组合物用于治疗和/或预防。一个具体实施方案中，本发明提供了第一方面所述的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段；或第二方面所述的抗 FGFR2b 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物；或第六方面所述的药物组合物用于治疗和/或预防 FGFR2b 介导的疾病或病症。

第八方面，本发明提供了一种治疗和/或预防 FGFR2b 介导的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的第一方面所述的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段；或第二方面所述的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物；或第六方面所述的药物组合物。

在一些实施方式中，上文各个方面所述的 FGFR2b 介导的疾病或病症为癌症或肿瘤。

在一些实施方式中，所述的癌症或肿瘤选自肺癌、肺鳞癌、肺腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、肝内胆管细胞癌、膀胱癌、结肠癌、前列腺癌、宫颈癌、大肠癌、胰腺癌、胃癌、食管癌症、肝细胞癌、肾细胞癌、头颈癌、间皮瘤、黑色素瘤、肉瘤、脑肿瘤、胃食管腺癌、恶性子宫瘤、胃食管交界腺癌、胆管癌、胆囊癌、肝内胆管癌、口腔黏膜癌和尿路上皮癌。

第九方面，本发明提供一种药物组合，其包含第一方面所述的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段；或第二方面所述的抗 FGFR2b 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物；或第六方面所述的药物组合物，以及另一种或多种治疗剂。

第十方面，本发明提供一种试剂盒，其包含第一方面所述的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段；或第二方面所述的抗 FGFR2b 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物；或第六方面所述的药物组合物。

附图说明

图 1：抗 FGFR2b 抗体药物偶联物抑制 SNU-5 细胞的增殖。

图 2：抗 FGFR2b 抗体药物偶联物抑制 SNU-16 细胞的增殖。

图 3：HC18 抗体药物偶联物在 SNU-16 小鼠皮下移植瘤模型中对肿瘤体积的影响。

图 4：HC18 抗体药物偶联物在 SNU-16 小鼠皮下移植瘤模型中对小鼠体重的影响。

图 5：不同 HC18-01 抗体药物偶联物在 SNU-16 小鼠皮下移植瘤模型中对肿瘤体积的影响。
图 6：不同 HC18-01 抗体药物偶联物在 SNU-16 小鼠皮下移植瘤模型中对小鼠体重的影响。
图 7：不同剂量的 HC18-01-ADC1 对 SNU-16 人胃癌移植瘤模型小鼠的抗肿瘤药效。
图 8：不同剂量的 HC18-01-ADC1 对 SNU-16 人胃癌移植瘤模型小鼠的体重影响。
图 9：不同剂量的 HC18-01-ADC1 对 KATO-III 人胃癌移植瘤模型小鼠的抗肿瘤药效。
图 10：不同剂量的 HC18-01-ADC1 对 KATO-III 人胃癌移植瘤模型小鼠的体重影响。
图 11：HC18-01-ADC1 对 xKATO-III 皮下移植模型小鼠的平均肿瘤体积的影响。
图 12：HC18-01-ADC1 对 xKATO-III 皮下移植瘤模型肿瘤重量的影响。
图 13：HC18-01-ADC1 对小鼠人肺癌肿瘤异种移植模型的平均肿瘤体积的影响。
图 14：HC18-01-ADC1 对人肺癌肿瘤异种移植模型的肿瘤重量的影响。

术语定义

除非另有说明，本发明的实施将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术，这些都在本领域的技术范围内。

为了可以更容易地理解本发明，某些科技术语具体定义如下。除非本文其它部分另有明确定义，否则本文所用的科技术语都具有本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义。关于本领域的定义及术语，专业人员具体可参考 Current Protocolsin Molecular Biology(Ausubel)。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之一的标准 3 字母和/或 1 字母代码。本文(包括权利要求书)所用单数形式包括其相应的复数形式，除非文中另有明确规定。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5%的下限和比指定数字数值大 5%的上限的范围内的数字数值。

术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项中的任意两项或更多项的组合。

术语“FGFR2b”指任何重组体或天然存在形式的成纤维细胞生长因子受体 2b(FGFR2b)、其变体或同系物，所述变体或同系物维持 FGFR2b 活性的例如至少 50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、 99%或 100%的活性。所述变体或同系物相比于天然存在的 FGFR2 蛋白在完整序列或部分序列 (例如，50、100、150 或 200 个连续氨基酸部分) 具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%氨基酸序列同一性。

术语“抗体”在本文中以最广意义使用并且涵盖多种抗体结构物，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体 (例如，双特异性抗体) 和抗体片段，只要它们显示出所需的抗原结合活性即可。完整抗体通常将包含至少两条全长重链和两条全长轻链，但在某些情况下可包括较少的链，例如骆驼中天然存在的抗体可仅包含重链。

术语“抗 FGFR2b 抗体”是指特异性与 FGFR2b 结合的抗体分子，其能够抑制 FGFR2b 活性。相对于不存在 FGFR2b 抗体，抗 FGFR2b 抗体能够抑制 FGFR2b 活性，例如，通过至少部分地或完全地阻断 FGFR2b 的刺激，减少、预防或延迟 FGFR2b 的活化，或失活、脱敏或下调 FGFR2b 的信号转导、活性或量。在一些实施方案中，相比于对照，抗体可以抑制 FGFR2b 活性的 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。

术语“抗体片段”指与完整抗体不同的分子，其包含完整抗体的一部分且能够结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于 Fv，Fab，Fab’，Fab’-SH，$F(ab')_2$；双抗体；线性抗体；单链抗体 (例如 scFv)；单结构域抗体；双价或双特异性抗体或其片段；骆驼科抗体 (重链抗体)；和由抗体片段形成的多特异性抗体 (例如双特异性抗体)。

术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域通常具有相似的结构，其中每个结构域包含四个保守的构架区 (FR) 和三个互补决定区 (CDR) (参见，例如，Kindt 等 Kuby Immunology，6th ed.，W.H.Freeman and Co.91 页 (2007))。单个 VH 或

VL 结构域足以给予抗原结合特异性。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环 (“超变环”) 和/或含有抗原接触残基 (“抗原接触点”) 的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。可变结构域中的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3，从 N-端开始顺序编号。在一个给定的可变区氨基酸序列中，各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派系统的任一种或其组合确定，所述指派系统包括例如：基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人. (1989) Nature 342: 877-883，Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948(1997))，基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)) , AbM (University of Bath)，Contact (University College London)，国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (http://imgt.cines.fr/)，以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类 (affinity propagation clustering) 的 North CDR 定义。

应该注意，基于不同的指派系统获得的同一抗体的可变区的 CDR 的边界可能有所差异。即不同指派系统下定义的同一抗体可变区的 CDR 序列有所不同。因此，在涉及用本发明定义的具体 CDR 序列限定抗体时，所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体，其可变区序列包含所述的具体 CDR 序列，但是由于应用了不同的方案(例如不同的指派系统或组合)而导致其所声称的 CDR 边界与本发明所定义的具体 CDR 边界不同。

除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 CDR 序列。

CDR 也可以基于与参考 CDR 序列 (例如本发明示例的 CDR 之任一) 具有相同的 AbM 编号位置而确定。在一些实施方式中，本发明的抗体的 CDR 根据 AbM 编号方案确定位置。

除非另有说明，否则在本发明中，当提及抗体可变区和 CDR 中的残基位置 (包括重链可变区残基) 时，是指根据 AbM 编号系统的编号位置。

如本文中所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

术语“嵌合抗体”是具有第一抗体的可变结构域和第二抗体的恒定结构域的抗体，其中第一抗体和第二抗体来自不同物种。通常，可变结构域获自啮齿动物等的抗体(“亲代抗体”)，而恒定结构域序列获自人抗体，使得与亲代啮齿动物抗体相比，所得嵌合抗体在人受试者中诱导不良免疫应答的可能性较低。

术语“人源化抗体”是指含有来自人和非人(例如小鼠、大鼠)抗体的序列的抗体形式。一般而言，人源化抗体包含基本所有的至少一个、通常两个可变结构域，其中所有或基本所有的超变环相当于非人免疫球蛋白的超变环，而所有或基本所有的构架(FR)区是人免疫球蛋白序列的构架区。人源化抗体任选可包含至少一部分的人免疫球蛋白恒定区(Fc)。

术语“全人抗体”是指只包含人免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。如在小鼠中、在小鼠细胞中或在来源于小鼠细胞的杂交瘤中产生，则全人抗体可含有鼠糖链。同样，“小鼠抗体”是指仅包含小鼠免疫球蛋白序列的抗体。或者，如果在大鼠中、在大鼠细胞中或在来源于大鼠细胞的杂交瘤中产生，则全人抗体可含有大鼠糖链。同样，“大鼠抗体”是指仅包含大鼠免疫球蛋白序列的抗体。

术语“Fc 区”用于定义包含至少一部分恒定区的免疫球蛋白重链的 C 端区域。该术语包括天然序列 Fc 区和变异 Fc 区。在一些实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区从 Cys226 或 Pro230 延伸至重链的羧基末端。但是，Fc 区的 C 端赖氨酸(Lys447)可能存在或不存在(此段中的编号是根据 EU 编号系统，也称为 EU 索引，如 Rabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991)。

术语“亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。分子 X 对其配

偶物 Y 的亲和力可以通常由平衡解离常数(KD)代表，平衡解离常数是解离速率常数和结合速率常数(分别是 kdis 和 kon)的比值。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是本文中的 ForteBio 动力学结合测定法。

术语“不结合”蛋白或细胞是指，不与蛋白或细胞结合，或者不以高亲和力与其结合，即结合蛋白或细胞的 KD 为 1.0×10^{-6}M 或更高，更优选 1.0×10^{-5}M 或更高，更优选 1.0×10^{-4}M 或更高、1.0×10^{-3}M 或更高，更优选 1.0×10^{-2}M 或更高。

术语“高亲和性”对于 IgG 抗体而言，是指对于抗原的 KD 为 1.0×10^{-6}M 或更低，优选 5.0×10^{-8}M 或更低，更优选 1.0×10^{-8}M 或更低、5.0×10^{-9}M 或更低，更优选 1.0×10^{-9}M 或更低。对于其他抗体亚型，“高亲和性”结合可能会变化。例如，IgM 亚型的“高亲和性”结合是指 KD 为 10^{-6}M 或更低，优选 10^{-7}M 或更低，更优选 10^{-8}M 或更低。

如本文所用，术语“结合”或“特异性结合”意指结合作用对抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。抗原结合位点与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法如通过放射性免疫测定 (RIA) 或生物膜薄层干涉测定法或 MSD 测定法或表面等离子体共振法 (SPR) 测定。

术语“半数有效浓度 (EC_{50})”是指在特定的暴露时间后诱导在基线和最大值之间的 50%的应答的药物、抗体或毒剂的浓度。

本文所述的术语“治疗剂”涵盖在预防或治疗肿瘤，例如癌症中有效的任何物质，包括化疗剂、细胞因子、血管生成抑制剂、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂 (例如免疫抑制剂) 。

术语“抗体药物偶联物”或“ADC”是指以共价键偶联治疗活性物质或活性药物成分的抗体或抗体片段，从而使得治疗活性物质或活性药物成分靶向至抗体的结合靶标以表现出其药理学功能。治疗活性物质或活性药物成分可以是能够杀死 ADC 靶向的细胞 (优选癌细胞) 的细胞毒素。治疗活性物质、活性药物成分或细胞毒素的共价连接可以以非位点特异性方式利用接头进行，或者以位点特异性方式进行。

术语“位点特异性偶联”是指将治疗活性物质或活性药物成分特异性连接到抗体的特定位点的连接方式。在一些实施方式中，所述偶联借助连接子完成。

术语“细胞毒性剂”可以和“细胞毒素”互换使用，在本发明中指抑制或破坏细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。

术语“接头”、“接头单元”和“连接子”在本申请中可以互换使用，指使抗体与 ADC 中的治疗活性物质或活性药物成分共价连接的化学模块。在一些实施方式中，接头可以包含将抗原与有效载荷连接的氨基酸残基。氨基酸残基可以形成二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元。氨基酸残基包括天然存在的那些以及非天然存在的氨基酸类似物，例如瓜氨酸或 β-氨基酸，例如 β-丙氨酸，或 ω-氨基酸如 4-氨基-丁酸。

根据性质分类，适用于本发明的接头可以是组织蛋白酶可降解的接头，例如缬氨酸-瓜氨酸 (val-cit) 接头、cBu-Cit 接头和 CX 接头；不可断裂接头例如 SMCC 接头或 MD 接头；酸敏接头、硅脂结构的接头、disulfide-carbamate 接头、MC-GGFG 接头、TRX 接头、含半乳糖苷的接头、焦磷酸酯接头、近红外敏感的接头、紫外敏感的接头例如 PC4AP。

本发明的接头还可以是一种或多种接头的组合，例如组织蛋白酶降解的接头可以与其它类型的接头组合，构成新的接头。因此，本发明所述的“接头”涵盖单个类型的接头，或不同类型接头的组合，只要其能够将本发明的抗体与药物偶联起来即可。

术语“负载”或“药物负载”或“有效负载”是指在 ADC 分子内每个抗体的平均有效负载数 (在本文中“有效负载”可与“治疗活性物质或活性药物成分”互换使用)。药物负载的范围可以为每个抗体 1-20 个治疗活性物质或活性药物成分。术语“药物/抗体比”或“DAR”是指偶联于抗体的治疗活性物质或活性药物成分(D)与抗体的比例。本文中所述 ADC 通常具有 1-20 的 DAR，在某些具体实施方案中具有 1-8、2-8、2-6、2-5、2-18、

4-16、5-12、6-10、3-8、4-6、6-10，和 2-4 的 DAR。代表性 DAR 值是 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15，通常表示为字母 D 和数字的组合，其中数字表示 DAR 的数值，例如 D2 表示 DAR 值为 2 的药物/抗体比。在一些实施方案中，DAR 是平均 DAR，即通过检测方法 (例如通过常规方法如 UV/可见光光谱法、质谱法、ELISA 测定、与 HPLC 进行表征。也可测得定量 DAR 值。DAR 可能受限于抗体上的连结位点数目。例如，在连结位点是半胱氨酸硫醇的情形下，抗体可能只有一或几个半胱氨酸硫醇基或可能只有一或几个具有充分反应性的硫醇基 (通过此硫醇基可连结连接单元) 。

术语“FGFR2b 介导的疾病或病症”是指由成纤维细胞生长因子受体 2b（FGFR2b）异常信号传导（例如基因突变、过度表达或异常激活）引发或推动的疾病状态。当 FGFR2b 信号传导出现异常，可能导致多种病理状况，例如癌症（如胃癌、乳腺癌和肺癌）、发育性疾病、纤维化和增生性疾病。在本发明一个具体的实施方案中，术语“FGFR2b 介导的疾病或病症”指与 FGFR2b 基因或蛋白的异常表达、突变或功能失调有关的癌症或肿瘤。

术语“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。想要的治疗效果包括但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态，以及缓解或改善预后。在一些实施方案中，本发明的抗体用来延缓疾病发展或用来减慢疾病的进展。

术语“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。在一些实施方式中，具有癌症家族病史的受试者是预防性方案的候选。通常，在癌症的背景中，术语“预防”是指在癌症的病征或症状发生前，特别是在具有癌症风险的受试者中发生前的药物施用。

术语“有效量”指本发明的抗体或缀合物或组合物的量或剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。有效量可以由作为本领域技术人员的主治医师通过考虑以下多种因素来容易地确定：诸如哺乳动物的物种；体重、年龄和一般健康状况；涉及的具体疾病；疾病的程度或严重性；个体患者的应答；施用的具体抗体；施用模式；施用制剂的生物利用率特征；选择的给药方案；和任何伴随疗法的使用。

术语“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。抗体或抗体片段或其缀合物或组合物的治疗有效量可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量和抗体或抗体部分在个体中激发所需反应的能力而变动。治疗有效量也是这样的一个量，其中抗体或抗体片段或其缀合物或组合物的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数 (例如肿瘤生长率、肿瘤体积等) 至少约 20%、更优选地至少约 40%、甚至更优选地至少约 50%、60%或 70%和仍更优选地至少约 80%或 90%。可以在预示人肿瘤中的功效的动物模型系统中评价化合物抑制可度量参数 (例如，癌症) 的能力。

术语“预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在对象中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量将小于治疗有效量。

术语“药物组合物”指这样的组合物，其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在，并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

术语“联合”指一种或多种其它治疗剂的施用包括同时(共同)施用和任意次序的连续施用。

术语“药学上可接受的盐”指本申请药物偶联物的盐，这类盐用于哺乳动物体内时可以具有安全性和/或有效性，且可以具有应有的生物活性，本申请抗体药物偶联物可以与酸形成盐。

术语“药学上可接受的载体”指药物制剂或组合物中除活性成分以外的对受试者无毒的成分。

术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，诸如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

具体实施方式

以下实施例进一步说明本发明，然而，应理解实施例以说明而非限定的方式来描述，并且本领域技术人员可以进行多种修改。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

在一些实施方式中，本发明提供了制备抗 FGFR2b 抗体的方法，其中所述方法包括在适于表达编码所述抗 FGFR2 抗体的核酸的条件下培养包含编码抗 FGFR2b 抗体的核酸或包含所述核酸的表达载体的宿主细胞，以及任选地分离所述抗 FGFR2b 抗体。在某个实施方案中，所述方法还包括从所述宿主细胞 (或宿主细胞培养基) 回收抗 FGFR2b 抗体。

为了重组产生本发明的抗 FGFR2b 抗体，首先分离编码本发明抗 FGFR2b 抗体的核酸，并将所述核酸插入载体，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸易于使用常规规程分离和测序，例如通过使用能够与编码本发明抗 FGFR2b 抗体的核酸特异性结合的寡核苷酸探针进行。

如本文所述制备的本发明的抗 FGFR2b 抗体可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于净电荷、疏水性、亲水性等因素，并且这些对本领域技术人员是显而易见的。可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的抗 FGFR2b 抗体的纯度，所述熟知分析方法包括大小排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。

现有技术描述了用于将细胞毒性剂或其他治疗剂与抗体偶联的多种方法。例如，可以通过赖氨酸侧链的氨基和抗体 N 末端的氨基，天门冬氨酸、谷氨酸和 C 末端的羧基或活化的半胱氨酸巯基在抗体中进行，以使缀合反应发生。

除非明确指明相反，否则本发明的实施将采用本领域技术内的常规化学、生物化学、有机化学、分子生物学、微生物学、重组 DNA 技术、遗传学、免疫学和细胞生物学的方法。

本公开的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的常规方法来确认结构，如果本公开涉及化合物的绝对构型，则该绝对构型可以通过本领域常规技术手段予以确证。

化合物依据本领域常规命名原则或者使用 ChemDraw®软件命名，市售化合物采用供应商目录名称。

实施例 1：鼠源 FGFR2b 抗体的人源化及制备 FGFR2b 抗体

参照 WO2023185778A1 公开的方法，制备本发明的鼠源抗体，其命名可简称为“HC18”，本发明引用 WO2023185778A1 全文作为参考。

本发明对照抗体 FPA144 抗体的制备参照 WO2015017600A1，本发明引用其全文作为参考。

将鼠源抗体 HC18 的 VH 和 VL 序列分别和已知的人源抗体数据库进行比对，找到分别与鼠源 VH 和 VL 序列同源性最高的人种系 (germline) 基因 VH 和 VL 序列。

本发明所用的人源化设计及 PTM 分析方法为：

1. 分析所选抗体的可变区序列，区分抗原结合域（CDR）和框架区（FR）。
2. 执行同源建模以获得母本抗体的建模结构。计算框架区的亲水性，确定位于框架区上的抗体内部的氨基酸（即亲水性<15%）。
3. 根据序列的同源性为 VH 和 VL 各选择一个人源化框架序列。将母本抗体的 CDR 移植到人源化框架上，从而得到移植抗体的序列，将其定义为 VH1 和 VL1。
4. 比较 VH1 和 VL1 与母本 VH 和 VL 序列。找出移植和母本抗体框架序列中所有不同的关键残基（即可能的回复突变位点）。
5. 根据以下原则在 VH1 和 VL1 序列中逐步进行一个或多个回复突变：
   a.对于抗体环相互作用的关键氨基酸。
   b.位于轻重链交界面的氨基酸。
   c.抗体核心形成关键氨基酸。
6. 每个抗体设计多条人源化序列。

7. 分析序列中的翻译后修饰和潜在降解位点，包括脱酰胺、异构氧化和糖基化等。

8. 在结构模型中识别表面上的 PTM 风险位点，如 N-糖基化位点、脱酰胺位点、异构化位点、氧化位点和未配对的半胱氨酸残基等，它们可能影响抗体的结合活性和下游生产。

9. 如抗体 CDR 区域存在高风险 PTM 位点，将考虑风险位点去除。

经上述分析，发现鼠源抗体 HC18 的 HCDR3 上有高风险的异构化位点 DG, 通过 PTM 移除，把 DG 替换为 DA，发现该替换对抗体的结合和成药性没有产生明显影响。

鼠源抗体 HC18 经人源化后获得人源化抗体 HC18-01，其 CDR 序列如表 1 所示。对人源化抗体进行构建、表达、纯化，并通过 SDS-PAGE 和 SEC-HPLC 鉴定该人源化抗体。结果表明各个抗体在 SDS-PAGE 非还原胶上的条带在 150kD 左右，在 SDS-PAGE 还原胶上的条带在 50 kD 左右和 25 kD 左右，符合预期大小，所有抗体的 SEC 单体纯度均大于 95%。

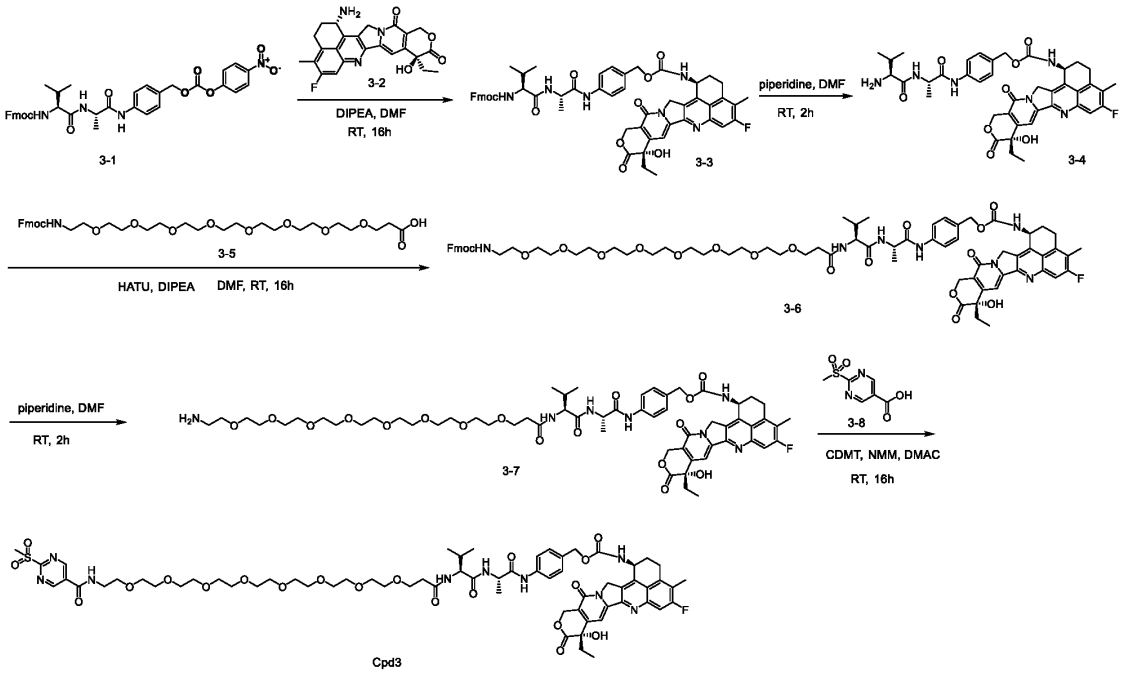
表 1 人源化抗体的 CDR 区氨基酸序列

克隆号	SEQ ID NO:	序列	
HC18-01	1	HCDR1	SYWMH
	2	HCDR2	SIYPENSDTSYNQKFKG
	11	HCDR3	YHGYDADY
	4	LCDR1	SASSSVSYMY
	5	LCDR2	STSNLAS
	6	LCDR3	QQRSSYPYT

实施例 2 连接子-毒素的制备方法

本发明使用的连接子和毒素，如 deruxtecan、GGFG-Dxd、Dxd、GGFG-Exd、Val-Ala-PAB 的制备参照 WO2014057687、WO1997046260、CN101795711，本发明引用其全文作为参考。

本发明使用的**连接子-毒素 Cpd3** 及其制备方法如下：



步骤 1：将(9H-芴-9-基)甲基((S)-3-甲基-1-(((S)-1-((4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸酯（**3-1**, 2.5 g, 3.6 mmol）、(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮（**3-2**, 1.6 g, 3.6 mmol）、N,N-二异丙基乙胺（965 mg, 7.5 mmol）溶于无水 N,N-二甲基甲酰胺（20 mL），反应液在该室温下搅拌 16 小时。LCMS 监测反应结束，得到 4-((S)-2-(S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸酯（**3-3**）。LCMS (ESI) m/z: 977.3 $[M+H]^+$ 。

步骤 2：向步骤 1 的反应液中直接加入六氢吡啶（464 mg, 5.4 mmol），反应液在室温下搅拌 2 小时。LCMS 监测原料反应完成，反应液直接 C18 柱色谱纯化分离得到 4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸酯（**3-4**）（1.8g）。LCMS (ESI) m/z: 755.2 $[M+H]^+$ 。

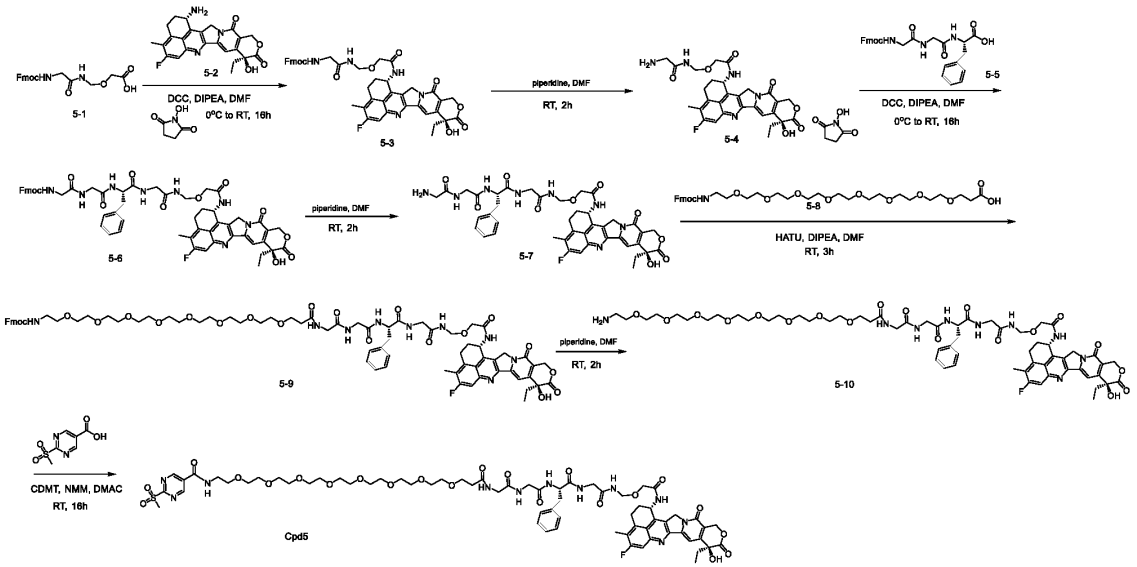
步骤 3：将 1-(9H-芴-9-基)-3-氧代-2,7,10,13,16,19,22,25,28-九氧杂-4-氮杂-三十一碳-31-酸（**3-5**, 1.8 g, 2.38 mmol）、4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸酯（**3-4**, 1.8 g, 2.38 mmol）、N,N-二异丙基乙胺（614 mg, 4.76 mmol）溶于无水 N,N-二甲基甲酰胺（10 mL）中，然后室温下搅拌 3 h，LCMS 监测反应完成，得 4-((33S,36S)-1-(9H-芴-9-基)-33-异丙基-36-甲基-3,31,34-三氧代-2,7,10,13,16,19,25,25,28-九氧杂-4,32,35-三氮杂-三十七-37-酰氨基)-苄基((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4': 6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸酯（**3-6**）。LCMS (ESI) m/z: 1400.5 $[M+H]^+$ 。

步骤 4：向步骤 3 的反应液中直接加入六氢吡啶（409 mg, 4.76 mmol），反应液在该室温下搅拌 2 小时。LCMS 监测原料反应完成，反应液直接 C18 柱色谱纯化得到 4-((29S,32S)-1-氨基-29-异丙基-32-甲基-27,30-二氧代-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂-28,31-二氮杂-三十三-33-酰氨基)苄基((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸酯（**3-7**）（1.2g）。LCMS (ESI) m/z: 1178.4 $[M+H]^+$ 。

步骤 5：将 4-((29S,32S)-1-氨基-29-异丙基-32-甲基-27,30-二氧代-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂-28,31-二氮杂-三十三-33-酰氨基)苄基((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸酯（**3-7**, 20 mg, 0.017 mmol）、2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-甲酸（**3-8**, 13.7 mg, 0.068 mmol）、4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉四氟硼酸盐（22.3 mg, 0.068 mmol）溶于无水 N,N-二甲基乙酰胺（3 mL），反应液在室温下搅拌 16 小时。经过 C18 柱色谱分离纯化得 4-((31S,34S)-31-异丙基-34-甲基-1-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1,29,32-三氧代-5,8,11,14,17,20,23,26-八氧杂-2,30,33-三氮杂-三十五-35-酰氨基-苄基(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸酯（2.3 mg，产率：10%），即 **Cpd3**。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.95 (s, 1H), 9.37 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.21 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.28 (s, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.42 – 4.34 (m, 1H), 4.22 – 4.17 (m,

1H), 3.62 – 3.53 (m, 10H), 3.52 – 3.46 (m, 28H), 2.38 (s, 3H), 2.33 (s, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.01 – 1.81 (m, 4H), 1.30 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.90 – 0.80 (m, 9H) 。

本发明使用的**连接子-毒素 Cpd5** 及其制备方法如下：



步骤 1：将 1-(9H-芴-9-基)-3,6-二氧代-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一烷-11-酸（**5-1**, 440 mg, 1.15 mmol）、(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮（500 mg, 1.15 mmol）溶于无水 N,N-二甲基甲酰胺（20 mL），在冰浴下加入 N,N'-二环己基碳二亚胺（308 mg, 1.5 mmol）、N-羟基丁二酰亚胺 （132 mg, 1.15 mmol）和 N,N-二异丙基乙胺（148 mg, 1.15 mmol），然后反应液在室温下搅拌 16 小时。LCMS 监测反应结束，通过用乙酸乙酯和水萃取，将有机相浓缩，通过甲醇与二氯甲烷体系（1：20）硅胶柱纯化得到(9H-芴-9-基)甲基(2-(((2-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基甲酸酯(**5-3**, 650 mg)。LCMS (ESI) m/z: 802.3 $[M+H]^+$ 。

步骤 2：将(9H-芴-9-基)甲基(2-(((2-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基甲酸酯（**5-3**, 650 mg, 0.81 mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（10 mL），然后加入六氢吡啶（69 mg, 5.4 mmol），反应液在该室温下搅拌 2 小时。LCMS 监测原料反应完成，反应液直接 C18 柱色谱纯化分离得到 2-氨基-N-((2-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺（**5-4**, 420 mg）。LCMS (ESI) m/z: 580.2 $[M+H]^+$ 。

步骤 3：将 2-氨基-N-((2-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺（**5-4**, 420 mg, 0.73 mmol）、(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)甘氨酰甘氨酰-L-苯丙氨酸（**5-5**, 370 mg, 0.73 mmol）溶于无水 N,N-二甲基甲酰

胺（10 mL），在冰浴下加入 N,N'-二环己基碳二亚胺（195 mg, 0.95 mmol）、N-羟基丁二酰亚胺（84 mg, 0.73 mmol）和 N,N-二异丙基乙胺（94 mg, 0.73 mmol），然后反应液在室温下搅拌 16 小时。LCMS 监测反应结束，通过用乙酸乙酯和水萃取，将有机相浓缩，通过甲醇与二氯甲烷体系（1：15）硅胶柱纯化得到(9H-芴-9-基)甲基((S)-10-苄基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基)氨基甲酸酯（**5-6**, 550 mg）。LCMS (ESI) m/z: 1063.5 $[M+H]^+$ 。

步骤 4：将(9H-芴-9-基)甲基((S)-10-苄基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基)氨基甲酸酯（**5-6**, 550 mg, 0.52 mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（5 mL），然后加入六氢吡啶（44 mg, 0.52 mmol），反应液在该室温下搅拌 2 小时。LCMS 监测原料反应完成，反应液直接 C18 柱色谱纯化分离得到((S)-10-苄基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基)胺（**5-7**, 400 mg）。LCMS (ESI) m/z: 841.4 $[M+H]^+$ 。

步骤 5：将 1-(9H-芴-9-基)-3-氧代-2,7,10,13,16,19,22,25,28-九氧杂-4-氮杂-三十一碳-31-酸（347 mg, 0.52 mmol）、HATU（274 mg, 0.72 mmol）和 N,N-二异丙基乙胺（124 mg, 0.96 mmol）溶于无水 N,N-二甲基甲酰胺（5 mL）中，然后室温下搅拌 1 h， 再加入((S)-10-苄基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基)胺（**5-7**, 400 mg, 0.48 mmol）然后室温下搅拌 16 h， LCMS 监测反应完成，反应液直接 C18 柱色谱纯化得到(9H-芴-9-基)甲基((S)-10-苄基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15,18-六氧代-3,21,24,27,30,33,36,39,42-九氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂四十四烷-44-基)氨基甲酸酯（**5-9**, 350 mg）。LCMS (ESI) m/z: 1486.6 $[M+H]^+$ 。

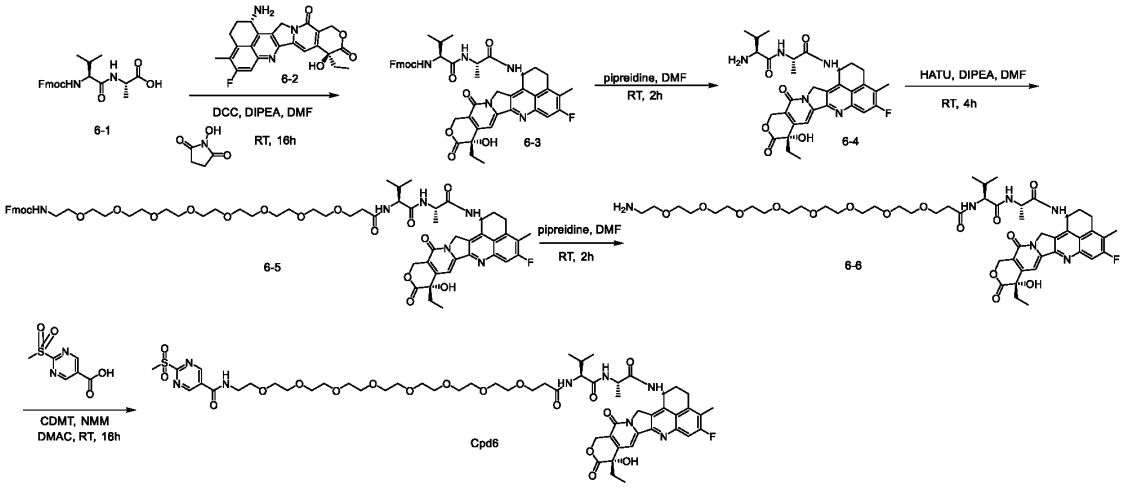
步骤 6：将(9H-芴-9-基)甲基((S)-10-苄基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15,18-六氧代-3,21,24,27,30,33,36,39,42-九氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂四十四烷-44-基）氨基甲酸酯（**5-9**, 350 mg, 0.24 mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（5 mL），然后加入六氢吡啶（20 mg, 0.24 mmol），反应液在该室温下搅拌 2 小时。LCMS 监测原料反应完成，反应液直接 C18 柱色谱纯化分离得到 1-氨基-N-((S)-10-苄基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十七烷-27-酰胺（**5-10**, 200 mg）。LCMS (ESI) m/z: 1264.6 $[M+H]^+$ 。

步骤 7：将 1-氨基-N-((S)-10-苄基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十七烷-27-酰胺（**5-10**, 100 mg，0.079 mmol）、2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-甲酸（64 mg，0.3 mmol）、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪（53 mg， 0.3 mmol）、N-甲基吗啉（182 mg，1.8 mmol）溶于无水 N,N-二甲基乙酰胺（5 mL），反应液在室温下搅拌 16 小时。通过 C18 柱色谱分离纯化得到 N-((S)-10-苄基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-

苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15,18-六氧代-3,21,24,27,30,33,36,39,42-九氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂四十四烷-44-基)-2-(甲磺酰基)嘧啶-5-甲酰胺（5mg），即 **Cpd5**。LCMS (ESI) m/z: 1448.6 $[M+H]^+$ 。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.37 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 9.12 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.21 – 8.07 (m, 2H), 7.99 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.21 (t, *J* = 15.2 Hz, 5H), 6.52 (s, 1H), 5.60 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.64 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.47 (s, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.76 – 3.66 (m, 4H), 3.59 – 3.53 (m, 8H), 3.51 – 3.45 (m, 29H), 2.39 (s, 5H), 2.18 (s, 2H), 2.00 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 1.84 (dd, *J* = 15.4, 7.8 Hz, 2H), 1.33 – 1.20 (m, 5H), 1.12 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 0.87 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H) 。

本发明使用的**连接子-毒素 Cpd6** 及其制备方法如下：



步骤 1：将(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)-L-缬氨酰-L-丙氨酸（**6-1**, 943 mg, 2.3 mmol）、(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮（1 g, 2.3 mmol）溶于无水 N,N-二甲基甲酰胺（20 mL），在冰浴下加入 N,N'-二环己基碳二亚胺（616 mg, 3 mmol）、N-羟基丁二酰亚胺（264 mg, 2.3 mmol）和 N,N-二异丙基乙胺（297 mg, 2.3 mmol），然后反应液在室温下搅拌 16 小时。LCMS 监测反应结束，通过用乙酸乙酯和水萃取，将有机相浓缩，通过甲醇与二氯甲烷体系（1：20）硅胶柱纯化得到(9H-芴-9-基)甲基((S)-1-(((S)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基甲酸酯（**6-3**, 730 mg）。LCMS (ESI) m/z: 828.3 $[M+H]^+$ 。

步骤 2：将(9H-芴-9-基)甲基((S)-1-(((S)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基甲酸酯（**6-3**, 730 mg, 0.88 mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（10 mL），然后加入六氢吡啶（75 mg, 0.88 mmol），反应液在该室温下搅拌 2 小时。LCMS 监测原料反应完成，反应液直接 C18 柱色谱纯化分离得到(S)-2-氨基-N-((S)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-

苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)-3-甲基丁酰胺（**6-4**, 450 mg）。LCMS (ESI) m/z: 606.2 $[M+H]^+$ 。

步骤 3：将 1-(9H-芴-9-基)-3-氧代-2,7,10,13,16,19,22,25,28-九氧杂-4-氮杂三十一碳-31-酸（592 mg, 0.89 mmol）、HATU（422 mg, 1.11 mmol）和 N,N-二异丙基乙胺（143 mg, 1.11 mmol）溶于无水 N,N-二甲基甲酰胺（5 mL）中，然后室温下搅拌 1 h，再加入(S)-2-氨基-N-((S)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)-3-甲基丁酰胺（450 mg, 0.74 mmol）然后室温下搅拌 4h，LCMS 监测反应完成，反应液直接 C18 柱色谱纯化得到(9H-芴-9-基)甲基((29S,32S)-33-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-29-异丙基-32-甲基-27,30,33-三氧代-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂-28,31-二氮杂-三十三烷基)氨基甲酸酯（**6-5**, 400 mg）。LCMS (ESI) m/z: 1251.6 $[M+H]^+$ 。

步骤 4：将(9H-芴-9-基)甲基((29S,32S)-33-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-29-异丙基-32-甲基-27,30,33-三氧代-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂-28,31-二氮杂-三十三烷基)氨基甲酸酯（**6-5**, 400 mg, 0.32 mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（5 mL），然后加入六氢吡啶（27 mg, 0.32 mmol），反应液在该室温下搅拌 2 小时。LCMS 监测原料反应完成，反应液直接 C18 柱色谱纯化分离得到 1-氨基-N-((S)-1-(((S)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂-二十七烷-27-酰胺（**6-6**, 210 mg）。LCMS (ESI) m/z: 1029.6 $[M+H]^+$ 。

步骤 5：将 1-氨基-N-((S)-1-(((S)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂-二十七烷-27-酰胺（**6-6**, 100 mg，0.097 mmol）、2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-甲酸（78 mg，0.39 mmol）、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪（68 mg，0.39 mmol）和 N-甲基吗啉（59 mg，0.582 mmol）溶于无水 N,N-二甲基乙酰胺（5 mL），反应液在室温下搅拌 16 小时。通过 C18 柱色谱纯化分离得到 N-((29S,32S)-33-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-29-异丙基-32-甲基-27,30,33-三氧代-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂-28,31-二氮杂-三十三烷基)-2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-甲酰胺（11.5 mg），即 **Cpd6**。LCMS (ESI) m/z: 1213.6 $[M+H]^+$

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.36 (s, 2H), 9.13 (s, 1H), 8.41 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (d, *J* = 18.9 Hz, 1H), 5.11 (d, *J* = 19.0 Hz, 1H), 4.32 – 4.21 (m, 1H), 4.17 – 4.06 (m, 1H), 3.58 – 3.52 (m, 8H), 3.48 (s, 25H), 3.44 (s, 6H), 2.40 (s, 3H), 2.29 (dd, *J* = 13.7, 7.1 Hz, 1H), 2.13 (s, 2H), 1.91 (ddd, *J* = 23.2, 22.6, 7.6 Hz, 4H), 1.27 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.83 – 0.72 (m, 6H)。

实施例 3：FGFR2b-ADC 制备

将抗体原液（HC18-01，15mg）从冰箱（-80℃）中取出，融化后，加入离心管中，然后加入 PB（20 mM，pH7.2，751 uL）缓冲液、DTPA-3Na（10 mM，375 uL）、TCEP（10 mM，94 uL）溶液，在 25℃，反应 2 小时。然后加入实施例 2 所述的连接子-毒素，如 Cpd3（5 mM，272 uL），于 25℃继续反应 2 小时。反应

完后，加入超滤离心管（30 KD）中，用 His/His-HCl（10 mM，pH5.5）透析置换，得 ADC 原液（11.4 mg），DAR：7.5-8，SEC 纯度≥95%。

以上实验所使用的连接子-毒素为实施例 2 中所述的 Cpd3，作为一个示例。抗体原液可以是 HC18 或 HC18-01；连接子-毒素可以是本领域常见的连接子与喜树碱类化合物的组合，包括但不限于 deruxtecan、Cpd3、Cpd5、Cpd6 等。

使用人源化抗体 HC18-01，用其他连接子-毒素进行上述实验。对各 ADC 样品进行验证，检测结果见下表 2。

表 2 - ADC 样品测试结果

抗体	抗体药物偶联物	连接子-毒素	ADC 检测结果		
			DAR	SEC 纯度	游离药物
HC18-01	HC18-01-ADC1	Cpd3	7.7	98.2%	0.68%
	HC18-01-ADC2	Cpd5	7.6	99.3%	0.004%
	HC18-01-ADC3	Cpd6	7.7	99.4%	未检出

实施例 4 增殖抑制实验

本实施例，以 Staurosporine 为阳性对照，基于 FACS 方法检测了 HC18-deruxtecan ADC 和 FPA144 抗体，与肿瘤细胞 SNU-5 和 SNU-16（细胞系来源如表 3 所示）表面的人 FGFR2b 的结合能力。其中 SNU-5 细胞表面不表达 FGFR2b。

表 3 细胞系来源

细胞系	代	癌种	供应商	货号	培养属性	培养基
SNU-5	P22	胃癌	ATCC	CRL-5973	悬浮	IMDM + 20% FBS
SNU-16	P18	胃癌	ATCC	CRL-5974	悬浮	RPMI-1640(GIBCO, #22400-089) + 10% FBS

实验方法：将 SNU-5 和 SNU-16 维持在 37℃，5%CO_2 的环境下，对各肿瘤细胞系进行常规传代培养，收获对数生长期的细胞，计数并铺板至 96 孔板（Greiner CELLSTAR®96 孔板，#655090）。将细胞浓度调整至适当的细胞密度，以每孔 135μL 细胞悬浮液加入 96 孔板中，使得 SNU-5 和 SNU-16 的细胞密度分别为 5000/孔、3000/孔、2000/孔，空白孔中加入 135μL 培养基，在 37℃，5%CO_2 和 100%RH 下培养过夜。每孔加入 15μL 按梯度稀释（3000、300、30、3nM）的 ADC 样品，空白孔中加入 15μL 培养基；37℃，5%CO_2 下培养 6 天；参照 Promega CellTiter Glo 试剂盒（Promega-G7573）测定发光细胞存活率，2104 EnVision 多标签读板器（PerkinElmer）读取发光情况。

结果如图 1~2 所示：HC18-deruxtecan 对两个胃癌细胞 SNU-5（图 1）、SNU-16（图 2）的细胞增殖抑制水平都优于 FPA144。

实施例 5：人源化抗体对不同种属抗原的亲和力

本实施例检测了人源化抗体 HC18-01 对人，食蟹猴，大鼠，小鼠抗原蛋白 FGFR2（IIIb）的亲和力。

实验方法：

1. 抗体的捕获

实验采用 1× PBS（含 0.05% Tween 20，pH 7.4）缓冲液作为测试缓冲液，将抗体用 PBS 缓冲液稀释至 1 μg/mL，流速设置为 10 μL/min，直接捕获到 Protein A 芯片的测试表面，持续捕获 20 s，捕获量可达到 80-100 RU 水平。

2. FGFR2b 样品的测试条件

抗原共设置 8 个分析浓度。针对 Human 及 Cyno 种属的 FGFR2b 蛋白，浓度梯度分别为 0 nM，1.5625 nM、3.125 nM、6.25 nM、12.5 nM、20 nM、50 nM、100 nM；针对 Mouse 及 Rat 种属的 FGFR2 蛋白，浓度梯度分别为 0 nM、6.25 nM、12.5 nM、20 nM、50 nM、100 nM、200 nM、400 nM。样品分析时设置流速为 30 μL/min，结合时间为 120 s，解离时间为 360 s，测试温度为 25°C。

3. 再生条件

以 Gly-HCl 缓冲液（pH 1.5，10 mM）作为再生缓冲液，再生时流速设置为 30 μL/min，再生 30s。再生完成后，稳定芯片 60 s 再分析下一个样品。

4. 动力学参数测定

实验采用多循环运行，以分析时间为横坐标，响应信号值为纵坐标。所得数据通过 BIAcore T200 分析软件进行拟合，所采用的拟合模型为 1:1 Langmuir 结合模型，确定其结合速率常数、解离速率常数及结合解离常数等动力学常数。

结果如表 4 所示。表明 HC18-01 抗体对各种属 FGFR2b 均具有良好的亲和力。

表 4：人源化抗体针对不同种属抗原的结合活性

抗原	ka (1/Ms)	kd (1/s)	T1/2(s)	KD(M)	$Chi^2(RU^2)$
人 FGFR2b	5.38E+05	1.90E-03	365.7	3.52E-09	0.384
食蟹猴 FGFR2b	5.85E+05	1.96E-03	353.4	3.35E-09	0.564
小鼠 FGFR2b	6.57E+04	3.08E-03	224.9	4.69E-08	0.0937
大鼠 FGFR2b	3.87E+04	9.08E-04	763.1	2.35E-08	0.126

实施例 6：ADC 在 SNU-16 小鼠皮下移植瘤模型中的抑瘤活性

本实施例，评价 ADC (HC18-deruxtecan) 在动物体内的抑瘤效果，以 FPA144 抗体为对照，所使用肿瘤细胞为胃癌细胞 SNU-16。

实验方法：使用 6-8 周龄、体重在 20 g 左右的雌性 Balb/C 裸鼠 (动物来源：维通利华)，每只裸鼠皮下单侧注射 10×10^6 个 SNU-16 细胞（SNU-16 细胞贴壁培养，培养条件为培养基中添加 10％胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素，37 ℃，5%CO_2。一周常规传代 2 次。当细胞在指数增长期时，收取细胞，计数，接种），接种体积 0.2 mL，待肿瘤平均体积达到约 150-200mm^3 时，进行随机分组分笼。每组 8 只荷瘤裸鼠，共 4 组，包括一个 Vehicle 阴性对照组、人 IgG1-deruxtecan（Dxd）组、HC18-deruxtecan 组、FPA144 组（给药剂量为 10m/kg，给药体积 1 μl/g），给药方式为 10mg/kg 尾静脉注射单次给药。每周测量 2 次瘤体积，共测量 11 次/5 周。肿瘤体积的计算公式为：$V = 0.5a \times b^2$，a 和 b 分别表示肿瘤的长径（mm）和短径（mm）。给药结束后 5 周将小鼠安乐死，取肿瘤并测量瘤重，分析瘤体积、瘤重和小鼠体重变化数据，计算抑瘤率。

实验结果如表 5 和图 3-4 显示，各组小鼠体重之间无明显差异，并且治疗期间各组小鼠体重均无明显变化，具体结果如图 4 所述，表明小鼠对 ADC 的耐受性良好。HC18-deruxtecan 显示出了显著的抑瘤效果，具体结果如图 3 所示。

表 5 ADC 对荷瘤小鼠的肿瘤的抑制

	肿瘤体积 (V) 计算方式：$V=a\times b^2/2$ (其中 a 是肿瘤直径中最长的，b 是肿瘤直径中最短的)								
	测量（天）								
	8	11	15	18	22	25	29	32	36
PBS	215.5	275	344.625	415.375	518.625	603.75	715.875	816	954.25
HC18-deruxtecan	87	67.25	44.75	44	44	43	69.25	77.25	105.375

10mg/kg									
人 IgG1-Dxd 10mg/kg	160.5	163.625	185.875	234.5	263.5	266.5	314.25	354.75	394.375
FPA144 10mg/kg	165.125	170.25	180.25	196	207.375	229	252	260.25	259.375

实施例 7：ADC 在 SNU-16 小鼠皮下移植瘤模型中的抑瘤活性

本实施例评价了人源化抗体 HC18-01 的不同 ADC 分子（HC18-01-deruxtecan、HC18-01-ADC1、HC18-01-ADC2、HC18-01-ADC3）在动物体内的抑瘤效果，所使用肿瘤细胞为胃癌细胞 SNU-16。

实验方法：使用 6-8 周龄、体重在 20 g 左右的雌性 Balb/C 裸鼠 (动物来源：维通利华)，每只裸鼠皮下单侧注射 10×10^6 个 SNU-16 细胞（SNU-16 细胞贴壁培养，培养条件为培养基中添加 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素，37 ℃，5%CO_2。一周常规传代 2 次。当细胞在指数增长期时，收取细胞，计数，接种），接种体积 0.2 mL，待肿瘤平均体积达到约 150-200mm^3 时，进行随机分组分笼。每组 8 只荷瘤裸鼠，共 11 组，包括一个 Vehicle 阴性对照组、HC18-deruxtecan 组、HC18-01-deruxtecan 组、HC18-01-ADC1 组、HC18-01-ADC2 组、HC18-01-ADC3 组（实验组给药剂量分别为 1，3mg/kg，给药体积 1 μl/g），实验组给药方式分别为 1 或 3mg/kg 尾静脉注射单次给药。每周测量 2 次瘤体积，共测量 11 次/5 周。肿瘤体积的计算公式为：$V = 0.5a \times b^2$，a 和 b 分别表示肿瘤的长径（mm）和短径（mm）。给药结束后 5 周将小鼠安乐死，取肿瘤并测量瘤重，分析瘤体积、瘤重和小鼠体重变化数据，计算抑瘤率。

实验结果如图 5 和 6 显示。各组小鼠体重之间无明显差异，并且治疗期间各组小鼠体重均无明显变化，具体结果如图 6 所述，表明小鼠对 ADC 的耐受性良好。HC18-01-deruxtecan、HC18-01-ADC1、HC18-01-ADC2、HC18-01-ADC3 显示出了显著的抑瘤效果，具体结果如图 5 所示。

实施例 8. 抗体药物偶联物 HC18-01-ADC1 在 SNU-16 人胃癌移植瘤模型中的抗肿瘤作用

本实施例进一步探索 HC18-01-ADC1 的不同单次给药剂量对人胃癌 SNU-16 移植瘤生长的抑制作用。实验方法同实施例 8 所述。

在本实施例中，设置一个 Vehicle 阴性对照组、0.5mg/kg HC18-01-ADC1 组、1mg/kg HC18-01-ADC1 组、3mg/kg HC18-01-ADC1 组、10mg/kg HC18-01-ADC1 组及 10mg/kg 市售贝玛珠单抗阳性对照组。

表 6 和图 7-8 记载了各实验组治疗的药效结果。

表 6：不同剂量的 HC18-01-ADC1 对人胃癌 SNU-16 移植瘤的抑制作用

组别	**治疗（静注，单次给药）**	**TGI (%)**	**T/C (%)**	**PRR**	**CRR**
1	溶剂对照（Vehicle）	-	-	-	-
2	HC18-01-ADC1, 0.5 mg/kg	35.29	64.71	0/8	0/8
3	HC18-01-ADC1, 1 mg/kg	70.61	29.39	0/8	0/8
4	HC18-01-ADC1, 3 mg/kg	80.00	20.00	0/8	0/8
5	HC18-01-ADC1, 10 mg/kg	97.05	2.95	8/8	0/8
6	贝玛珠单抗 10 mg/kg	22.90	77.10	0/8	0/8

Note: TGI：肿瘤生长抑制率 CR：完全缓解(Complete response)，即，肿瘤体积=0 mm^3; PR：部分缓解(Partial response) ，即，相对于基线时肿瘤体积至少降低 30% CRR：完全反应率(Complete Response Rate) ，指完全消除肿瘤的受试者的比例，即 CR/实验使用的动物数 PRR：部分反应率(Partial Response Rate)，指治疗后肿瘤部分缩小的受试者比例，即 PR/实验使用的动物数 T/C：相对肿瘤增殖率，T/C (%) = $V_T/V_c \times 100$(V_T：处理组平均肿瘤体积；V_c ：溶剂对照组平均肿瘤体积)

图 7 显示了不同剂量下 HC18-01-ADC1 的抗肿瘤药效。0.5-10 mg/kg HC18-01-ADC1 单次给药可剂量依赖地抑制 SNU-16 移植瘤生长，且 10 mg/kg HC18-01-ADC1 优于等剂量贝玛珠单抗的抗肿瘤作用。

图 8 显示了不同剂量下小鼠的体重变化。实验结果显示，各组小鼠体重之间无明显差异。

实施例 9 抗体药物偶联物 HC18-01-ADC1 在 KATO-III 人胃癌移植瘤模型上的抗肿瘤作用

本实施例进一步探索 HC18-01-ADC1 的不同单次给药剂量对人胃癌 **KATO-III** 移植瘤生长的抑制作用。

本实施例设置一个 Vehicle 阴性对照组、0.4mg/kg HC18-01-ADC1 组、2mg/kg HC18-01-ADC1 组、10mg/kg HC18-01-ADC1 组、10mg/kg 市售贝玛珠单抗阳性对照组、10mg/kg HC18-01 裸抗对照组。实验方法同实施例 11 所述。

人胃癌 KATO-III 细胞贴壁培养，培养条件为 IMDM 培养基（补充 20%胎牛血清和 1% Antibiotic-Antimycotic），37℃、5% CO_2 培养。每周用胰酶消化常规传代 2 次。当细胞在指数增长期且细胞活力大于 95%时，收取细胞，计数，接种。

表 7 和图 9-10 显示了实验的结果。

表 7：第 60 天 HC18-01-ADC1 对 KATO-III 人胃癌移植瘤的治疗结果

组别	治疗（静注，单次给药）	TGI (%)	T/C (%)	PRR	CRR	IR (%)
1	Vehicle	-	-	-	-	
2	HC18-01-ADC1, 0.4 mg/kg	30.51	69.48	0/8	0/8	30.90
3	HC18-01-ADC1, 2 mg/kg	99.27	0.73	8/8	3/8	99.26
4	HC18-01-ADC1, 10 mg/kg	99.98	0.02	8/8	7/8	99.99
5	贝玛珠单抗 10 mg/kg	80.36	19.64	2/8	0/8	79.80
6	HC18-01 10 mg/kg	66.61	33.38	1/8	0/8	66.30
Note: TGI：肿瘤生长抑制率； CR：肿瘤体积=0 mm^3； PR：相对于基线时肿瘤体积至少降低 30%； CRR：完全消除肿瘤的受试者的比例，即 CR/实验使用的动物数； PRR：治疗后肿瘤部分缩小的受试者比例，即 PR/实验使用的动物数； T/C：相对肿瘤增殖率，T/C（%）=$V_T/V_c \times 100$(V_T：处理组平均肿瘤体积；V_c：溶剂对照组						

平均肿瘤体积)；
IR：瘤重抑制率，IR（%）=[1-(处理组平均瘤重/溶剂对照组平均瘤重)]×100。

图 9 显示了不同剂量下 HC18-01-ADC1 的抗肿瘤药效，0.4-10 mg/kg HC18-01-ADC1 单次给药可剂量依赖、强效抑制 KATO-III 移植瘤生长；0.4 mg/kg HC18-01-ADC1 与 10 mg/kg HC18-01 抗肿瘤作用相当；10 mg/kg HC18-01-ADC1 的抗肿瘤效果优于等剂量的贝玛珠单抗。

图 10 显示了不同剂量下小鼠的体重变化。实验结果显示，各组小鼠体重之间无明显差异。

实施例 10 抗体药物偶联物 HC18-01-ADC1 在人胃癌 xKATO-III 移植瘤模型上的抗肿瘤作用

本实施例利用人胃癌 xKATO-III 小鼠皮下异种移植瘤模型，评价受试物 HC18-01-ADC1 及其裸抗 HC18-01 对人胃癌的体内抗肿瘤作用，并分别与受试物贝玛珠单抗和 Paclitaxel（紫杉醇注射液，来源：四川汇宇制药）进行药效对比，同时探索不同给药方案下的药效作用，为受试物 HC18-01-ADC1 临床适应症选择及临床试验方案设计提供参考。

人胃癌 xKATO-III 细胞贴壁培养，培养条件为 IMDM 培养基（补充 20%胎牛血清和 1% Antibiotic-Antimycotic），37℃、5% CO_2 培养。每周用胰酶消化常规传代 2 次。当细胞在指数增长期且细胞活力大于 95%时，收取细胞，计数，接种（接种代次 P9）。

细胞系	肿瘤类型	来源	供应商	货号
KATO-III	胃癌	人源性	American Type Culture Collection	HTB-103
xKATO-III	胃癌	人源性	Wuxi Apptec，KATO-III 皮下接种在 CB17 SCID 小鼠上，然后取肿瘤制备细胞悬液	/

使用 6-8 周龄、体重在 20 g 左右的雌性 SCID Beige 小鼠（上海灵畅生物科技有限公司），接种 0.2 mL（内含 $10*10^6$ xKATO-III 细胞+50%基质胶）混匀的细胞悬液。肿瘤平均体积达到 202 mm^3 时随机分组给药。其中给药设置如表 8 所示。

表 8：HC18-01-ADC1 的给药方案

组别	个数	药物	剂量（mg/kg）	给药体积（mL/kg）	给药途径	给药频次
1	8	Vehicle	-	10	静脉注射（IV）	单次给药
2	8	HC18-01-ADC1	0.4	10		
3	8	HC18-01-ADC1	2	10		
4	8	HC18-01-ADC1	10	10		
5	8	HC18-01	10	10		
6	8	贝玛珠单抗	10	10		
7	8	Paclitaxel	10	10		每三天一次 *4 周

每周测量 2 次肿瘤的体积，肿瘤体积的计算公式为：$V = 0.5a \times b^2$，a 和 b 分别表示肿瘤的长径（mm）和短径（mm）。

进行药效指标 TGI、T/C、肿瘤完全缓解（CR）和部分缓解（PR）的小鼠数量、瘤重抑制率（IR）等

的评价。其中，各个指标根据如下公式或者方式计算：

1. TGI（%）=[1-(V_{Ti}/V_{T0})/(V_{ci}/V_{c0})]×100%（V_{Ti}：治疗组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，V_{T0}：治疗组在给药第 0 天的肿瘤体积均值，V_{ci}：溶剂对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，V_{c0}：溶剂对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值）；

2. T/C（%）= V_T/V_c× 100（V_T：处理组平均肿瘤体积；V_c：溶剂对照组平均肿瘤体积）。

3. 肿瘤完全缓解 CR 或部分缓解 PR 的小鼠数量，CR 指小鼠肿瘤体积为 0 mm^3，PR 指相比分组时，小鼠肿瘤体积下降超过 30%。

4. IR（%）=[1-（处理组平均瘤重/溶剂对照组平均瘤重）]×100%。

实验数据以平均值±标准误差（Mean±SEM）表述。基于实验结束时获得的数据进行统计学分析评估组间差异。各组间差异采用 Graphpad Prism 10.0 软件，采用单因素方差分析（One-way Analysis of Variance，ANOVA）进行统计学分析，p<0.05 认为有显著性差异。

实验结果如图 11-12 所示。受试物 HC18-01-ADC1、HC18-01、Bemarituzumab 和 Paclitaxel 对 xKATO-III 皮下移植瘤小鼠的体重影响较低，第 60 天各给药组和 Vehicle 组动物体重及体重变化率无显著性差异，整个实验周期内各组动物体重无明显变化，临床观察无异常，本实施例给药方案下药物剂量安全。

第 60 天（D60）检测 xKATO-III 皮下移植模型小鼠的平均肿瘤体积，受试物对 xKATO-III 皮下移植瘤模型肿瘤重量的影响如图 12 所示。与 Vehicle 组相比，除了 0.4 mg/kg HC18-01-ADC1 组（p>0.05），其余各给药组的平均肿瘤体积均显著降低（p<0.0001，$^{****}p$<0.0001 表示对比溶剂对照 Vehicle 组）；10 mg/kg HC18-01-ADC1 平均肿瘤体积显著小于 0.4 mg/kg HC18-01-ADC1（p<0.0001，$^{####}p$<0.0001 表示对比 HC18-01-ADC1 0.4 mg/kg）。

基于 D60 肿瘤体积计算得出受试物对 xKATO-III 皮下移植瘤模型的 T/C（%）和 TGI（%），基于 D60 肿瘤重量（TW）计算 IR（%），基于肿瘤缓解情况计算 CR 率和 PR 率，结果如下表 9 所示.

表 9：D60，HC18-01-ADC1 对 xKATO-III 皮下移植肿瘤抑制的结果。

Group	肿瘤体积（mm^3, Mean±SEM）	T/C（%）	TGI（%）	TW (g, Mean±SEM)	IR (%)	CR	PR
Vehicle	1751.96±349.78	-	-	1.795±0.987	-	-	-
HC18-01-ADC1 0.4 mg/kg	1217.36±240.97	69.48	30.51	1.240±0.665	30.90	0/8	0/8
HC18-01-ADC1 2 mg/kg	12.80±5.66 ****####	0.73	99.27	0.013±0.017 ****####	99.26	3/8	8/8
HC18-01-ADC1 10 mg/kg	0.30±0.30 ****####	0.02	99.98	0.000±0.000 ****####	99.99	7/8	8/8
HC18-01 10 mg/kg	584.94±141.04 ****	33.38	66.61	0.605±0.427 ****	66.30	0/8	1/8
Bemarituzumab 10 mg/kg	344.02±74.42 ****	19.64	80.36	0.363±0.229 ****	79.80	0/8	2/8
Paclitaxel	84.36±22.99	4.82	95.18	0.083±0.062	95.38	0/8	5/8

Group	肿瘤体积（mm^3, Mean±SEM）	T/C（%）	TGI（%）	TW (g, Mean±SEM)	IR (%)	CR	PR
10 mg/kg	****			****			

****p<0.0001 对比溶剂对照组，####p<0.0001 对比 HC18-01-ADC1 0.4 mg/kg 组

HC18-01-ADC1 单次给药可显著抑制人胃癌 xKATO-III 小鼠皮下移植瘤生长，2-10 mg/kg 范围内剂量越高，抑瘤效果越好，呈现明显的剂量相关性；HC18-01-ADC1 肿瘤生长抑制作用持久，10 mg/kg 单次给药后 60 天未见反弹效应。等剂量下，HC18-01-ADC1 抑瘤作用优于 Bemarituzumab 和 Paclitaxel。

实施例 11 抗体药物偶联物 HC18-01-ADC1 在人肺癌肿瘤异种移植（PDX）模型上的抗肿瘤作用

本实验的目的是评价受试物 HC18-01-ADC1 在人肺癌肿瘤异种移植（PDX）模型上的抗肿瘤作用，并与受试物多西他赛（Docetaxel）及 Bemarituzumab 进行药效对比。

本实施例选用人源性肺癌肿瘤组织样本（NO. LD1-0025-200783）进行药效实验，经验证，该样本 FGFR2 表达阳性。

从生物样本库中获得肿瘤组织（NO. LD1-0025-200783，FP2+1 代），将其进行无菌清洗及修剪，剔除血凝块、脂肪等非肿瘤组织及内部坏死灶后，将组织修剪成合适的 3×3×3 mm^3 组织块，再清洗，根据瘤块体积加入适量 Matrigel 基质胶，置于冰盒上备用，按标准操作规程处理 Nu/Nu 小鼠后，取 3×3×3 mm^3 的肿瘤组织块接种至 Nu/Nu 小鼠四肢皮下，每只动物接种 1-2 个位点。每周观察 2 次小鼠肿瘤体积及体重变化，当肿瘤体积达到 100-200 mm^3 左右，表示肿瘤组织复苏成功。肿瘤组织复苏成功后，待肿瘤体积平均生长达到 620 mm^3，安乐死荷瘤动物并于生物安全柜中剥离肿瘤，去除非肿瘤组织和坏死组织后制成接种肿瘤组织块（FP2+2 代）。使用 BALB/c Nude 小鼠进行接种，将肿瘤组织块（FP2+2 代）分割为若干份 3×3×3 mm^3 的组织块并接种至小鼠皮下（FP2+3 代）。小鼠接种后，每周监测 2 次肿瘤体积及体重变化，当平均肿瘤体积达到 118 mm^3（肿瘤潜伏期为 14 天），即表示 PDX 建模成功并达到分组标准。

按照表 10 公开的方案对 PDX 模型小鼠给药。

表 10. HC18-01-ADC1 治疗人肺癌肿瘤异种移植的给药方案

组别	小鼠个数	药物	给药剂量（mg/kg）	给药方式	给药频率
1	6	溶剂对照(Vehicle)	-	静脉注射 *i.v.*	单次给药
2	6	HC18-01-ADC1	3		
3	6	HC18-01-ADC1	10		
4	6	Bemarituzumab	10		
5	6	Docetaxel	10		每周一次 *4 周

每周固定时间记录两次体重，每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径，计算肿瘤体积。

肿瘤体积的计算公式为：$V = 0.5a \times b^2$，a 和 b 分别表示肿瘤的长径（mm）和短径（mm）。

实验终点，动物安乐死后，解剖取肿瘤，所有肿瘤称重。

1. 计算实验周期内小鼠的体重变化率，RCBW（%）=(BW_{Di}-BW_{D0})/BW_{D0}×100%（BW_{Di}：在给药第 i

天的体重，BW_{D0}：在给药第 0 天的体重）。

2. 药物在小鼠上的抑瘤疗效用 TGI（Tumor Growth Inhibition，%）或相对肿瘤增殖率 T/C（%）评价；其中，TGI（%）=[1-(V_{Ti}/V_{T0})/(V_{ci}/V_{c0})]×100%（V_{Ti}：治疗组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，V_{T0}：治疗组在给药第 0 天的肿瘤体积均值，V_{ci}：溶剂对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，V_{c0}：溶剂对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值）；T/C %=V_T/V_c×100 %（V_T：治疗组平均肿瘤体积；V_c：溶剂对照组平均肿瘤体积）。

3. 统计肿瘤完全缓解（Complete Response，CR）或部分缓解（Partial Response，PR）的小鼠数量；其中，CR 指小鼠肿瘤体积为 0 mm^3；PR 指相比分组时，肿瘤体积下降超过 30%。

4. 计算肿瘤消退率 TRR（%），TRR（%）=（1-V_{Dn}/V_{D0}）×100（V_{Dn}：第 n 天测量的肿瘤体积；V_{D0}：第 0 天分组时的肿瘤体积）。

受试物 HC18-01-ADC1、Bemarituzumab 和 Docetaxel 对人肺癌 PDX 小鼠的体重影响较低。整个实验周期内各组动物体重无明显变化，临床观察无异常，说明本实施例给药方案下药物剂量安全。

本实施例的结果如图 13-14 和表 11-12 所示。在第 31 天，与溶剂对照组组相比，发现 10 mg/kg Bemarituzumab 组对肿瘤体积几乎无抑制作用，故终止该组实验。与溶剂对照组组相比，其余各给药组的平均肿瘤体积均显著降低（p<0.001），继续进行实验至终点第 38 天。实验结束时，与 10 mg/kg Docetaxel 组相比，10 mg/kg HC18-01-ADC1 组平均肿瘤体积显著降低（p<0.05）；10 mg/kg HC18-01-ADC1 组平均肿瘤体积显著小于 3 mg/kg HC18-01-ADC1 组（p<0.05）。其中，$^{*}p$ 表示对比溶剂对照组，$^{\#}p$ 表示对比 10 mg/kg HC18-01-ADC1 组。（注：实验第 31 天，因动物肿瘤体积较大，为满足实验动物伦理标准，终止了溶剂对照组及 Bemarituzumab 组的实验进程；其余组别实验进程持续至第 38 天终点）。

实验终点 D38 对剩余各组测量肿瘤重量，结果如图 14 和表 12 所示，与 10 mg/kg Docetaxel 组相比，10 mg/kg HC18-01-ADC1 组平均肿瘤重量显著降低（p<0.01）；10 mg/kg HC18-01-ADC1 平均肿瘤重量显著小于 3 mg/kg HC18-01-ADC1（p<0.01）。其中，$^{\&\&}p$、$^{\&}p$ 表示对比 HC18-01-ADC1 10 mg/kg 组。

表 11：第 31 天抗肿瘤疗效及统计学结果

组别	肿瘤体积（mm^3）（Mean±SEM）	T/C（%）	TGI（%）	PR	CR
溶剂对照 Vehicle	1760.89 ± 282.97	/	/	/	/
HC18-01-ADC1 3 mg/kg	344.39 ± 79.72***	19.65	80.35	1/6	/
HC18-01-ADC1 10 mg/kg	21.67 ± 7.72****	1.23	98.77	6/6	2/6
Bemarituzumab 10 mg/kg	1623.30 ± 423.16	92.41	7.59	/	/
Docetaxel 10 mg/kg	376.69 ± 78.97***	21.40	78.60	/	/

*表示对比溶剂对照组

表 12：第 38 天（终点）抗肿瘤疗效及统计学结果

组别	肿瘤体积（mm^3）（Mean±SEM）	肿瘤重量（mg）（Mean±SEM）	PR	CR

组别	肿瘤体积（mm^3）（Mean±SEM）	肿瘤重量（mg）（Mean±SEM）	PR	CR
Vehicle	/	/	/	/
HC18-01-ADC1 3 mg/kg	508.54 ± 118.60$^{\#}$	0.509 ± 0.120$^{\&\&}$	1/6	/
HC18-01-ADC1 10 mg/kg	37.57 ± 16.24	0.035 ± 0.152	5/6	2/6
Docetaxel 10 mg/kg	477.21 ± 124.63$^{\#}$	0.472 ± 0.119$^{\&}$	/	/

$^{\#}p$、$^{\&}p$ 对比 HC18-01-ADC1 10 mg/kg 组

HC18-01-ADC1 单次给药可显著抑制小鼠皮下人肺癌 PDX（NO. LD1-0025-200783）模型肿瘤生长，剂量越高，抑瘤效果越好，呈现明显的剂量相关性。10 mg/kg HC18-01-ADC1 单次给药后 38 天未见反弹效应，抑瘤作用持久。等剂量下，HC18-01-ADC1 抑瘤作用显著优于抗体药物 Bemarituzumab 和化疗药物 Docetaxel。

实施列 12：连接子-毒素 Cpd3 血浆稳定性验证

将受试 ADC 分子 HC18-01-ADC1（浓度 0.2 mg/mL）在不同种属血浆（人/猴/大鼠/小鼠）中，37℃恒温孵育至 21 天后，LC-MS/Ms 检测不同时间点，血浆中分析物浓度。本实施例对照样品为 mc-Exd（市售可得）。下表 13 记载了 HC18-01-ADC1（分析物 Cpd3）与对标 HC18-01-mc-Exd（分析物 mc-Exd，即，用马来酸接头替换 cpd3 甲磺酰胺接头，其余连接子部分相同，毒素部分为 Exd）的实验参数。表 13 记载了 HC18-01-ADC1 的血浆稳定性。

释放率（%）是指 ADC 和血浆孵育一定时间后，测量血浆中游离药物的含量，并根据血浆中游离药物的含量与 ADC 中药物总量的比值，计算得到的血浆中游离药物的脱落率。

	释放率%					
时间(天)	小鼠(cpd3)	大鼠(cpd3)	PBS(cpd3)	猴(cpd3)	人(cpd3)	人(MCEXD)
0	0.022579	0.007904	0.010831	0.005913	0.00524	0.004414
1	0.225079	0.021867	0.008157	0.012929	0.014422	0.018863
2	0.379084	0.03584	0.007962	0.018247	0.024872	0.038196
3	0.459457	0.050437	0.009504	0.026307	0.034688	0.055581
5	0.518569	0.069552	0.016012	0.034396	0.048173	0.0729
7	0.919939	0.118262	0.032815	0.04912	0.082101	0.123981
14	1.29914	0.171207	0.063883	0.066713	0.12079	0.18601
21	1.223323	0.281205	0.18117	0.055209	0.1574	0.241082

实验结果显示人源化抗体 HC18-01 偶联 Cpd3（DAR8）具有良好的血浆稳定性，在不同种属血浆中具稳定性。Cpd3 在人、猴、大鼠中表现出极高的稳定性，且优于对照 mc-EXD。

序列表

HC18	HCDR1	SEQ ID NO:1	SYWMH
	HCDR2	SEQ ID NO:2	SIYPENSDTSYNQKFKG
	HCDR3	SEQ ID NO:3	YHGYDGDY
	LCDR1	SEQ ID NO:4	SASSSVSYMY
	LCDR2	SEQ ID NO:5	STSNLAS
	LCDR3	SEQ ID NO:6	QQRSSYPYT
	VH	SEQ ID NO:7	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKTSGYTFTSYWMHWV KQRPGQGLEWIGSIYPENSDTSYNQKFKGKAKLTAVTSA STAYMDLSSLTNEDSAVYYCSIYHGYDGDYWGQGTTLT VSS
	VL	SEQ ID NO:8	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMYWFQQKP GTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEA EDAATYYCQQRSSYPYTFGGGTKLEIK
	重链	SEQ ID NO:9	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKTSGYTFTSYWMHWV KQRPGQGLEWIGSIYPENSDTSYNQKFKGKAKLTAVTSA STAYMDLSSLTNEDSAVYYCSIYHGYDGDYWGQGTTLT VSSASTKPGSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLPGK
	轻链	SEQ ID NO:10	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMYWFQQKP GTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEA EDAATYYCQQRSSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
HC18 -01	HCDR1	SEQ ID NO:1	SYWMH
	HCDR2	SEQ ID NO:2	SIYPENSDTSYNQKFKG
	HCDR3	SEQ ID NO:11	YHGYDADY
	LCDR1	SEQ ID NO:4	SASSSVSYMY
	LCDR2	SEQ ID NO:5	STSNLAS
	LCDR3	SEQ ID NO:6	QQRSSYPYT
	VH	SEQ ID NO:12	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTSYWMHWV RQAPGQGLEWMGSIYPENSDTSYNQKFKGRVTLTADTSI STAYMELSRLRSDDTVVYYCSIYHGYDADYWGQGTLVT VSS
	VL	SEQ ID NO:13	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMYWFQQKPG QAPKLWIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPED FAVYYCQQRSSYPYTFGQGTKLEIK

	重链	SEQ ID NO:14	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTSYWMHWV RQAPGQGLEWMGSIYPENSDTSYNQKFKGRVTLTADTSI STAYMELSRLRSDDTVVYYCSIYHGYDADYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	轻链	SEQ ID NO:15	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMYWFQQKPG QAPKLWIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPED FAVYYCQQRSSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
人 IgG1 重链恒定区		SEQ ID NO:16	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
人轻链恒定区的 Kappa 型		SEQ ID NO:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

权利要求

1. 一种特异性结合 FGFR2b 的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段，其包含：

(1) 如 SEQ ID NO:7 所示的 VH 中含有的 3 个 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 或其变体；和/或，如 SEQ ID NO:8 所示的 VL 中含有的 3 个 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3) 或其变体；或，

(2) 如 SEQ ID NO:12 所示的 VH 中含有的 3 个 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 或其变体；和/或，如 SEQ ID NO:13 所示的 VL 中含有的 3 个 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3) 或其变体。

2. 权利要求 1 所述的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段，其包含：

1） 包含如 SEQ ID NO: 1 所示序列或由其组成的 HCDR1；
包含如 SEQ ID NO: 2 所示序列或由其组成的 HCDR2；
包含如 SEQ ID NO:3 所示序列或由其组成的 HCDR3；
包含如 SEQ ID NO:4 所示序列或由其组成的 LCDR1；
包含如 SEQ ID NO:5 所示序列或由其组成的 LCDR2；和
包含如 SEQ ID NO: 6 所示序列或由其组成的 LCDR3；或

2） 包含如 SEQ ID NO: 1 所示序列或由其组成的 HCDR1；
包含如 SEQ ID NO:2 所示序列或由其组成的 HCDR2；
包含如 SEQ ID NO: 11 所示序列或由其组成的 HCDR3；
包含如 SEQ ID NO: 4 所示序列或由其组成的 LCDR1；
包含如 SEQ ID NO: 5 所示序列或由其组成的 LCDR2；和
包含如 SEQ ID NO: 6 所示序列或由其组成的 LCDR3。

3. 权利要求 1 或 2 所述的抗 FGFR2b 抗体及其抗原结合片段，其包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中：

(1) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:7 组成；所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:8 组成；或

(2) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:12 组成；所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:13 组成。

4. 权利要求 1-3 中任一项所述的抗 FGFR2b 抗体及其抗原结合片段，其包含重链和轻链，其中

1）所述重链包含如 SEQ ID NO:9 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:9 组成；所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:10 组成；或

2）所述重链包含如 SEQ ID NO:14 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列具有至少 90%、

91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:14 组成；所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:15 组成。

5. 如式(I)所述的抗 FGFR2b 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物：

Ab-(L-D)m [式(I)]

其中，

L 为接头单元；

D 为具有细胞毒性的小分子药物；

m 为偶联于 Ab 的 L-D 单元的平均数，且 m 选自 1~10，优选为 2~8；

Ab 为权利要求 1-4 中任一项所述的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段。

6. 权利要求 5 所述的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中所述抗 FGFR2b 抗体或其片段包含如下 CDR：HCDR1 包含如 SEQ ID NO: 1 所示的序列或由其组成，HCDR2 包含如 SEQ ID NO:2 所示的序列或由其组成，HCDR3 包含如 SEQ ID NO: 11 所示的序列或由其组成，LCDR1 包含如 SEQ ID NO: 4 所示的序列或由其组成，LCDR2 包含如 SEQ ID NO: 5 所示的序列或由其组成，和 LCDR3 包含如 SEQ ID NO: 6 所示的序列或由其组成。

7. 权利要求 5 或 6 所述的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中所述抗 FGFR2b 抗体或其片段包含轻链可变区和重链可变区：

所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由其组成；

所述重链可变区包含 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由其组成。

8. 权利要求 5-7 中任一项所述的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中，

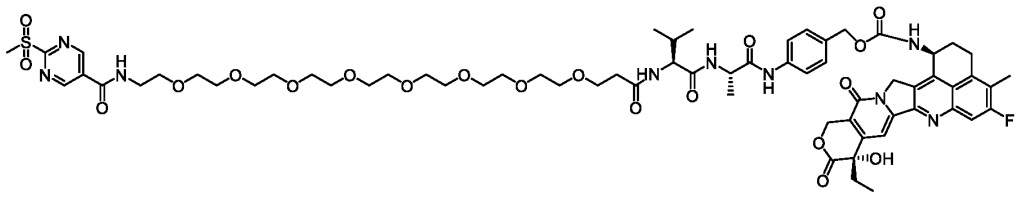
L 为接头单元，其为一种或多种 L'的组合；所述的 L'选自羰基、氨基、酰胺基、氨酰基、-$(PEG)_n$-、-$(CH_2)_n$-、含杂原子的-$(CH_2)_n$-、-(C≡C)-、-(CH=CH)-、-O-、-S-、马来酰亚胺基 (mc)、马来酰亚胺基丙酰基 (MP)、甲基磺酰基嘧啶基、缬氨酸-瓜氨酸 (val-cit)、缬氨酸-丙氨酸(val-ala)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸盐（SMCC）、丙氨酸-苯丙氨酸 (ala-phe)、苯丙氨酸-赖氨酸(phe-lys)、对氨基苄氧羰基(PAB)、二甲基乙二胺（DMED）、N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶硫基)戊酸酯 (SPP)、N-琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯 (SMCC)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯 (SIAB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯 (SPDB)、N-琥珀酰亚胺基 3-(吡啶-2-基二硫代)-丙酸酯 (SPDP)、甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸（GGFG）、乙酰基-赖氨酸-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基 (AcLys-vc-PABC)；其中 n 独立地选自 1~20 中的整数；

D 为具有细胞毒性的小分子药物，其选自单甲基澳瑞他汀类化合物、喜树碱类化合物或美登素类生物碱中的一种或多种；

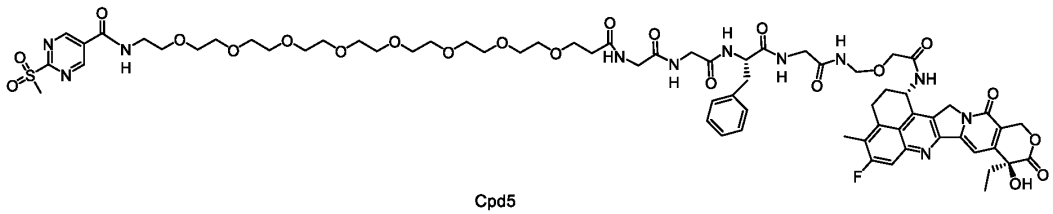
m 为偶联于 Ab 的 L-D 单元的平均数，其中 m 选自 1~10。

9. 权利要求 5-8 中任一项所述的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中所述偶联物包含多个 D 成分，所述多个 D 成分可以是不同治疗活性物质或药物活性成分的组合，或者是相同治疗活性物质或药物活性成分的组合，所述的 D 优选为喜树碱类化合物，更优选为依喜替康、Dxd(1)、Dxd(2)或 SN-38。

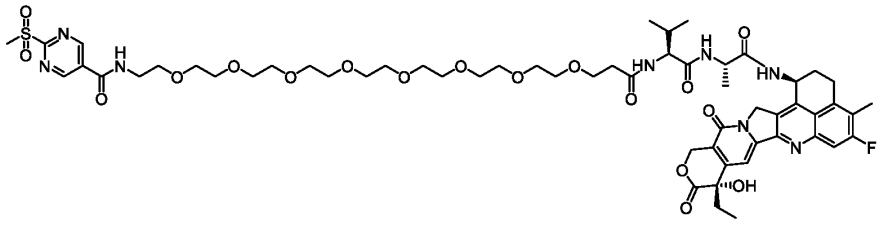
10. 权利要求 9 所述的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中（L-D）部分衍生自式 Cpd3、式 Cpd5 及式 Cpd6 所示的结构：



Cpd3 ，

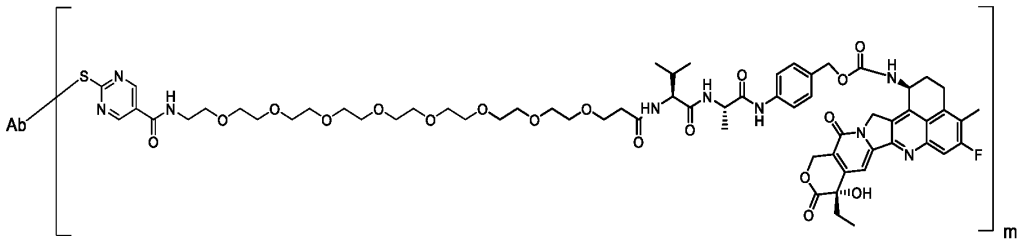


Cpd5 ，

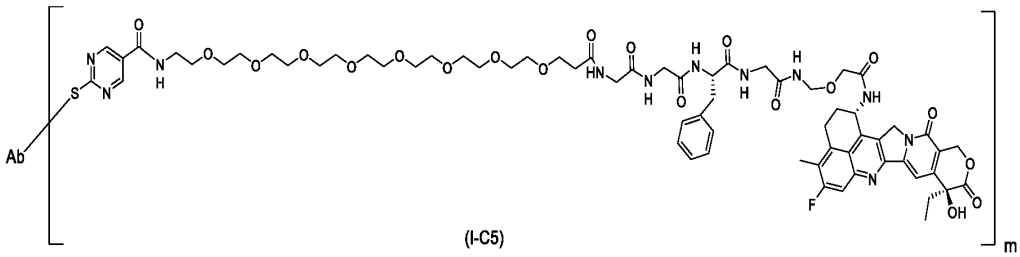


Cpd6 。

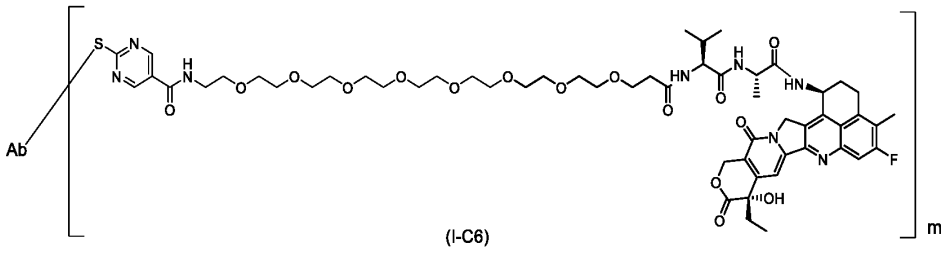
11. 如权利要求 5-10 中任一项任一项所述的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中所述抗体药物偶联物结构如(I-C3)、式(I-C5)及式(I-C6)所示：



(I-C3) ，



(I-C5) ，



(I-C6)；

其中，

m 为平均连接数，且 m 独立地选自 1~10；

Ab 为如权利要求 1 至 4 任意一项所述的抗 FGFR2b 抗体或其抗原结合片段。

12. 分离的核苷酸分子，其编码权利要求 1-4 中任一项所述的抗 FGFR2b 的抗体或其抗原结合片段，或其重链可变区和/或轻链可变区。

13. 表达载体，其包含权利要求 12 所述的核苷酸分子。

14. 宿主细胞，其包含权利要求 12 所述的核苷酸分子或权利要求 13 所述的表达载体。

15. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-4 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 5-11 中任一项所述的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，和药学上可接受的赋形剂。

16. 权利要求 1-4 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 5-11 中任一项所述的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物或如权利要求 15 所述的药物组合物在制备用于治疗和/或预防 FGFR2b 介导的疾病或病症的药物中的用途。

17. 一种治疗和/或预防 FGFR2b 介导的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用权利要求 1-4 中任一项所述的抗体；权利要求 5-11 中任一项所述的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物；或权利要求 15 所述的药物组合物。

18. 如权利要求 16 所述的用途或权利要求 17 所述的方法，其中所述的疾病或病症为肿瘤和/或癌症；所述的肿瘤和/或癌症选自：肺癌、肺鳞癌、肺腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、肝内胆管细胞癌、膀胱癌、结肠癌、前列腺癌、宫颈癌、大肠癌、胰腺癌、胃癌、食管癌、肝细胞癌、肾细胞癌、头颈癌、间皮瘤、黑色素瘤、肉瘤、脑肿瘤、胃食管腺癌、恶性子宫瘤、胃食管交界腺癌、胆管癌、胆囊癌、肝内胆管癌、口腔黏膜癌和尿路上皮癌。