抗体药物缀合物及其制备方法和用途

本申请是以 CN 申请号为 202010410633.5，申请日为 2020 年 5 月 15 日的申请为基础，并主张其优先权，该 CN 申请的公开内容在此作为整体引入本申请中。

技术领域

本发明属于生物医药技术领域。具体而言，本发明涉及抗 Claudin 18.2 抗体-药物缀合物（ADC）及含有所述 ADC 的组合物，以及它们的用途。

背景技术

胃癌的治疗主要以手术切除为主，对于不可切除或复发胃癌，化疗是主要的治疗手段，但现有条件下化疗仅能改善症状，延长生存期。目前国际上无一致公认的进展期胃癌标准化疗方案。生物大分子药物方面除曲妥珠单抗（Trastuzumab）、雷莫芦单抗（Ramucirumab）、帕博丽珠单抗（Pembrolizumab）等获批外，其它胃癌靶向治疗药物大多结果不甚理想或尚处于临床研究的早期阶段。现有药物的核心缺陷是非手术治疗未满足的临床需求，晚期或复发性胃癌的治疗选择非常有限，预后极差，死亡率高。作为高发癌症，目前胃癌药物需求极大。

Claudin 18.2（CLDN 18.2）是 Claudin 蛋白家族成员。Claudin 家族蛋白是一类介导细胞与细胞之间紧密连接的蛋白，不同亚型的 Claudin 蛋白表达于不同的组织，与不同类型的癌症有关。Claudin 18.2 在正常组织中的表达仅限于胃粘膜细胞，不表达于其它正常组织中。Claudin 18.2 高表达于 70% 的原发性胃腺癌及其转移瘤中，在其它一些癌症如胰腺癌，食管癌和非小细胞肺癌中也有表达。Claudin 18.2 在肿瘤组织中的高特异性表达使 Claudin 18.2 成为肿瘤免疫治疗的非常好的靶点。

发明内容

本申请的发明人在 PCT/CN2019/126495 中记载了与 Claudin 18.2 具有高特异性和高亲和力的抗体，该申请全部内容以参考方式并入本文并成为本申请内容的一部分。本申请的发明人经过大量创造性的劳动，进一步发明了 Claudin 18.2 抗体-药物缀合物（ADC），为肿瘤的治疗提供了安全有效的药物选择。

具体地，发明人将高亲和力和特异性结合 Claudin 18.2 的抗体与生物活性分子通过连接子连接，得到一类靶向 Claudin 18.2 的抗体-药物缀合物以及含有所述缀合物的组合物。所述缀合物或组合物对一些 Claudin 18.2 表达的肿瘤细胞具有较高的杀伤活性。在动物体内试验中，所述缀合物能够有效抑制 Claudin 18.2 阳性肿瘤生长，尤其是胃癌或胃腺癌，并且具有较高的安全性。

抗体-药物缀合物

在一个方面，本发明提供特异性结合人 CLDN18.2 的抗体-药物缀合物，其结构如式(I)所示，

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

式(I)

其中，D 为生物活性分子片段；L 为连接子；

γ选自1-10之间的整数（例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10）；优选地，γ选自1-8之间的整数（例如1、2、3、4、5、6、7或8）；

A为特异性结合人CLDN18.2的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，特异性结合人CLDN18.2的抗体或其抗原结合片段包含：

（1）如下的三个重链CDRs：如SEQ ID NOs: 13，14或23所示的VH（重链可变区）所含的CDR-H1、CDR-H2以及CDR-H3；和/或，

如下的三个轻链CDRs：如SEQ ID NO: 15或24所示的VL（轻链可变区）所含的CDR-L1、CDR-L2以及CDR-L3；

或，

（2）如下的三个重链CDRs：（1）中所述的CDR-H1或与其相比含有氨基酸突变的变体，（1）中所述的CDR-H2或与其相比含有氨基酸突变的变体，和（1）中所述的CDR-H3或与其相比含有氨基酸突变的变体；和/或，

如下的三个轻链CDRs：（1）中所述的CDR-L1或与其相比含有氨基酸突变的变体，（1）中所述的CDR-L2或与其相比含有氨基酸突变的变体，和（1）中所述的CDR-L3或与其相比含有氨基酸突变的变体；

其中，（2）中所述的三个重链CDRs和/或三个轻链CDRs中至少一个CDR与（1）中相应的CDR 相比含有氨基酸突变，所述氨基酸突变为一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1个，2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加）；所述含有突变的抗体或其抗原结合片段仍然能特异地结合CLDN18.2；优选地，特异地结合人CLDN18.2；优选地，所述的置换是保守置换。

在一些实施方案中，所述CDRs根据IMGT或AbM编号系统定义。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段还包括来自人的免疫球蛋白的构架区(FRs)。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

（1-1）按IMGT编号系统定义的如下三个重链CDRs：序列为SEQ ID No：1的CDR-H1，序列为SEQ ID Nos：2或21的CDR-H2，和序列为SEQ ID No：3的CDR-H3；和/或，

按IMGT编号系统定义的如下三个轻链CDRs：序列为SEQ ID No：4的CDR-L1，序列为SEQ ID No：5的CDR-L2，和序列为SEQ ID No：6的CDR-L3；

或，

（1-2）如下的三个重链CDRs：（1-1）中所述的CDR-H1或与其相比含有氨基酸突变的变体，（1-1）中所述的CDR-H2或与其相比含有氨基酸突变的变体，和（1-1）中所述的CDR-H3或与其相比含有氨基酸突变的变体；和/或，

如下的三个轻链CDRs：（1-1）中所述的CDR-L1或与其相比含有氨基酸突变的变体，（1-1）中所述的CDR-L2或与其相比含有氨基酸突变的变体，和（1-1）中所述的CDR-L3或与其相比含有氨基酸突变的变体；

其中，所述的三个重链CDRs和/或三个轻链CDRs中至少一个CDR与（1-1）中相应的CDR相比含有氨基酸突变，所述氨基酸突变为一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2

个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）；所述含有突变的抗体或其抗原结合片段仍然能特异地结合人 CLDN18.2；优选地，所述的置换是保守置换；

或，

（2-1）按 AbM 编号系统定义的如下三个重链 CDRs：序列为 SEQ ID No：7 的 CDR-H1，序列为 SEQ ID Nos：8 或 22 的 CDR-H2，和序列为 SEQ ID No：9 的 CDR-H3；和/或，

按 AbM 编号系统定义的如下三个轻链 CDRs：序列为 SEQ ID No：10 的 CDR-L1，序列为 SEQ ID No：11 的 CDR-L2，和序列为 SEQ ID No：12 的 CDR-L3；

或，

（2-2）如下的三个重链 CDRs：（2-1）中所述的 CDR-H1 或与其相比含有氨基酸突变的变体，（2-1）中所述的 CDR-H2 或与其相比含有氨基酸突变的变体，和（2-1）中所述的 CDR-H3 或与其相比含有氨基酸突变的变体；和/或，

如下的三个轻链 CDRs：（2-1）中所述的 CDR-L1 或与其相比含有氨基酸突变的变体，（2-1）中所述的 CDR-L2 或与其相比含有氨基酸突变的变体，和（2-1）中所述的 CDR-L3 或与其相比含有氨基酸突变的变体；

其中，所述的三个重链 CDRs 和/或三个轻链 CDRs 中至少一个 CDR 与（2-1）中相应的 CDR 相比含有氨基酸突变，所述氨基酸突变为一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）；所述含有突变的抗体或其抗原结合片段仍然能特异地结合人 CLDN18.2；优选地，所述的置换是保守置换。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段还包括来自人的免疫球蛋白的构架区(FRs)。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

（1）下述的 VH 和/或 VL，其中 CDRs 按 IMGT 编号系统定义：

（1-1）：包含如下 3 个 CDRs 的 VH：序列为 SEQ ID No：1 的 CDR-H1，序列为 SEQ ID Nos：2 或 21 的 CDR-H2，和序列为 SEQ ID No：3 的 CDR-H3；和/或，

包含如下 3 个 CDRs 的 VL：序列为 SEQ ID No：4 的 CDR-L1，序列为 SEQ ID No：5 的 CDR-L2，和序列为 SEQ ID No：6 的 CDR-L3；

或，

（1-2）：与（1-1）中所述的 VH 或 VL 相比，至少一个 CDR 含有突变，所述突变为一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）；优选地，所述的置换为保守置换；所述含有突变的抗体或其抗原结合片段仍然能特异地结合 CLDN18.2；优选地，特异性地结合人 CLDN18.2；

或，

（2）下述的 VH 和/或 VL，其中 CDRs 按 AbM 编号系统定义：

（2-1）：包含如下 3 个 CDRs 的 VH：序列为 SEQ ID No：7 的 CDR-H1，序列为 SEQ ID Nos：8 或 22 的 CDR-H2，和序列为 SEQ ID No：9 的 CDR-H3；和/或，

包含如下 3 个 CDRs 的 VL：序列为 SEQ ID No：10 的 CDR-L1，序列为 SEQ ID No：11 的

CDR-L2，和序列为 SEQ ID No：12 的 CDR-L3；

或，

（2-2）：与（2-1）中所述的 VH 或 VL 相比，至少一个 CDR 含有突变，所述突变为一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）；优选地，所述的置换为保守置换；所述含有突变的抗体或其抗原结合片段仍然能特异地结合 CLDN18.2；优选地，特异性地结合人 CLDN18.2。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的 VH 和/或 VL 中包括来自人或鼠的免疫球蛋白的构架区(FRs)。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

（1）SEQ ID NO：13 或 14 所示的 VH；和/或，SEQ ID NO：15 所示的 VL；

或者，

（2）所述抗体或其抗原结合片段所包含的 VH 与（1）中所述的 VH 相比，具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的同一性；和/或，所述抗体或其抗原结合片段所包含的 VL 与（1）中所述的 VL 相比，具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的同一性；所述含有同一性序列的抗体或其抗原结合片段仍然能特异地结合 CLDN18.2；优选地，特异性地结合人 CLDN18.2；

再或者，

（3）所述抗体或其抗原结合片段所包含的 VH 与（1）中所述的 VH 相比，具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）；和/或，所述抗体或其抗原结合片段所包含的 VL 与（1）中所述的 VL 相比，具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）；优选地，所述的置换是保守置换。所述含有突变的抗体或其抗原结合片段仍然能特异地结合 CLDN18.2；优选地，特异性地结合人 CLDN18.2。

在以上任一方面中，所述抗体或其抗原结合片段可以进一步包含来源于哺乳动物（例如，鼠或人）免疫球蛋白的恒定区或其变体。

在一些实施方案中，所述抗体或包含：

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

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

多5个氨基酸的置换、缺失或添加；例如1个，2个，3个，4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加）。

在一些实施方案中，恒定区被改变，例如被突变，以修饰抗CLDN18.2抗体分子的性质（例如改变下列中的一个或更多个特性：Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能）。可以通过将抗体恒定区中的至少一个氨基酸残基替换为不同残基，产生功能改变，例如，改变抗体对效应子配体（如FcR或补体C1q）的亲和力，从而改变效应子功能（例如增强）。在一些实施方案中，恒定区被改变从而改变（例如增强）抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）、补体依赖的细胞毒性（CDC）和/或抗体依赖性细胞吞噬作用（ADCP）。

在一些实施方案中，所述CH是IgG重链恒定区，例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链恒定区。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含人IgG1的重链恒定区。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO：16所示的CH或其变体，所述变体与SEQ ID NO：16相比具有至多20个氨基酸的保守置换（例如至多15个、至多10个、或至多5个氨基酸的保守置换；例如1个，2个，3个，4个或5个氨基酸的保守置换）。所述含有突变的CH保留大体与SEQ ID NO：16相同的功能。

在一些实施方案中，所述CL选自κ或λ的轻链恒定区。

在一些实施方案中，所述CL是κ轻链恒定区（例如人κ轻链）。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO：17所示的CL或其变体，所述变体与SEQ ID NO：17相比具有至多20个氨基酸的保守置换（例如至多15个、至多10个、或至多5个氨基酸的保守置换；例如1个，2个，3个，4个或5个氨基酸的保守置换）。所述含有突变的CL保留大体与SEQ ID NO：17相同的功能。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO：16所示的CH和/或如SEQ ID NO：17所示的CL。

在一些实施方案中，所述抗体包括由SEQ ID NO：13所示序列的VH和SEQ ID NO：16所示的CH组成的重链，和，

由SEQ ID NO：15所示序列的VL和SEQ ID NO：17所示的CL组成的轻链。

在一些实施方案中，所述抗体包括由SEQ ID NO：14所示序列的VH和SEQ ID NO：16所示的CH组成的重链，和，

由SEQ ID NO：15所示序列的VL和SEQ ID NO：17所示的CL的轻链。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

（1）重链，其包含选自下列的氨基酸序列：

（1-1）SEQ ID NO：18所示的序列；

（1-2）与SEQ ID NO：18所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例

如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或

（1-3）与 SEQ ID NO：18 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列；

和

（2）轻链，其包含选自下列的氨基酸序列：

（2-1）SEQ ID NO：20 所示的序列；

（2-2）与 SEQ ID NO：20 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或

（2-3）与 SEQ ID NO：20 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列。

在一些实施方案中，上述（1-2）和（2-2）中所述的置换是保守置换。所述含有突变的 CH 保留大体与 SEQ ID NO：16 相同的功能。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

（1）重链，其包含选自下列的氨基酸序列：

（1-1）SEQ ID NO：19 所示的序列；

（1-2）与 SEQ ID NO：19 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或

（1-3）与 SEQ ID NO：19 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列；

和

（2）轻链，其包含选自下列的氨基酸序列：

（2-1）SEQ ID NO：20 所示的序列；

（2-2）与 SEQ ID NO：20 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或

（2-3）与 SEQ ID NO：20 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列。

在一些实施方案中，上述（1-2）和（2-2）中所述的置换是保守置换。优先地，上述含有突变或同一性序列的抗体或其抗原结合片段仍然能特异地结合人 CLDN18.2。

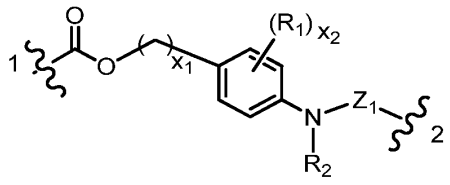
在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段选自 ScFv、Fab、Fab’、$(Fab')_2$、Fv 片段、二硫键连接的 Fv(dsFv)、双抗体(diabody)、双特异性抗体和多特异性抗体。

在一些实施方案中，所述(D-L)$_\gamma$-A 结构如式(II)所示：

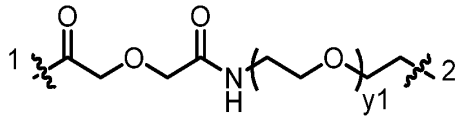
$$\{D-[L_1-(L_2)_{m1}-(L_3)_{m2}-(L_4)_{m3}-E]\}_\gamma-A$$

式(II)

其中，

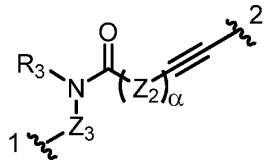


L_1 为 ；其中，各 R_1 和 R_2 各自独立地为氢（例如氘或氚）、卤素、羧酸、磺酸、氰基、C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、氰基取代的 C_{1-6} 烷基（例如-CH_2CN）、C_{1-6} 烷氧基、C_{2-10} 烯基或 C_{2-10} 炔基；Z_1 为氨基酸或 2-10 个氨基酸组成的肽；x_1 和 x_2 各自独立地为 0、1、2、3、4、5 或 6；并且 L_1 的 1 位置处与 D 相连、L_1 的 2 位置处与 L_2 相连；

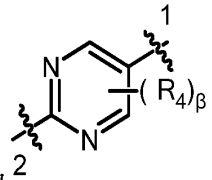


L_2 为 ；其中，y_1 为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；并且 L_2 的 1 位置处与 L_1 相连、L_2 的 2 位置处与 L_3 相连；

L_3 选自 5-12 元杂芳环；



L_4 为 ，其中 Z_2 选自 C_{1-6} 亚烷基、C_{2-10} 亚烯基、C_{2-10} 亚炔基和 C_{3-8} 亚环烷基；R_3 选自氢（例如氘或氚）和 C_{1-6} 烷基；Z_3 不存在或者选自 C_{1-6} 亚烷基；或者，R_3 与 Z_3 连同其所连接的氮原子形成 4-8 元杂环基；α 为 0、1、2、3、4、5 或 6，并且 L_4 的 2 位置处与 E 相连、L_4 的 1 位置处与 L_3 相连；



E 为 ；其中，各 R_4 独立地为氢（例如氘或氚），β 为 0、1、2、3、4、5 或 6，并且 E 的 2 位置处与 A 相连、E 的 1 位置处与 L_4 相连；

m_1、m_2 和 m_3 各自独立地为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；

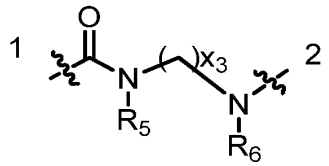
A，D 和 γ 如前文所述。

在一些实施方案中，所述(D-L)$_\gamma$-A 结构如式(III)所示：

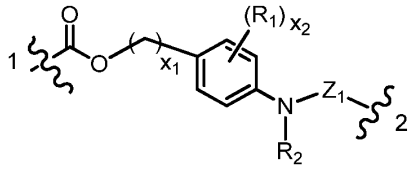
$$\{D-[(L_1')_{m4}-L_1-(L_5)_{m5}-(L_3)_{m2}-(L_4)_{m3}-E]\}_\gamma-A$$

式(III)

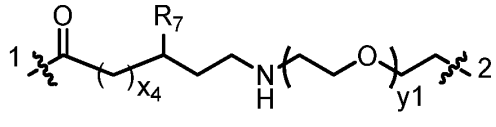
其中，



L_1'为 ；其中，R_5和 R_6各自独立地为氢（例如氘或氚）或 C_{1-6}烷基；x_3为 1、2、3、4、5 或 6；并且，如果 L_1'存在，其 1 位置处与 D 相连、2 位置处与 L_1相连；

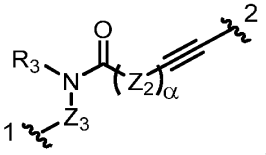


L_1为 ；其中，各 R_1和 R_2各自独立地为氢（例如氘或氚）、卤素、羧酸、磺酸、氰基、C_{1-6}烷基、卤代 C_{1-6}烷基、氰基取代的 C_{1-6}烷基（例如-CH_2CN）、C_{1-6}烷氧基、C_{2-10}烯基或 C_{2-10}炔基；Z_1为氨基酸或 2-10 个氨基酸组成的肽；x_1和 x_2各自独立地为 0、1、2、3、4、5 或 6；并且，L_1的 1 位置处与 L_1'相连（当 L_1'存在时），或者，L_1的 1 位置处与 D 相连（当 L_1'不存在时）；L_1的 2 位置处与 L_5相连；

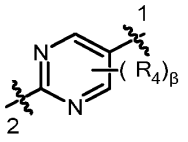


L_5为 ；其中，R_7为氢或 C_{1-6}烷基，或者 R_7与其 γ-C 上的 N 原子连接形成 5-6 元杂环基；x_4为 1、2、3、4、5 或 6；y_1为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；并且 L_5的 1 位置处与 L_1相连、L_5的 2 位置处与 L_3相连；

L_3选自 5-12 元杂芳环；



L_4为 ，其中 Z_2选自 C_{1-6}亚烷基、C_{2-10}亚烯基、C_{2-10}亚炔基和 C_{3-8}亚环烷基；R_3选自氢（例如氘或氚）和 C_{1-6}烷基；Z_3不存在或者选自 C_{1-6}亚烷基；或者，R_3与 Z_3连同其所连接的氮原子形成 4-8 元杂环基；α 为 0、1、2、3、4、5 或 6，并且 L_4的 2 位置处与 E 相连、L_4的 1 位置处与 L_3相连；

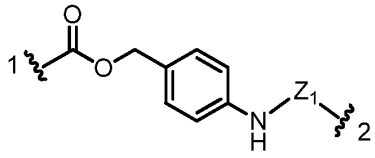


E 为 ；其中，各 R_4独立地为氢（例如氘或氚），β 为 0、1、2、3、4、5 或 6，并且 E 的 2 位置处与 A 相连、E 的 1 位置处与 L_4相连；

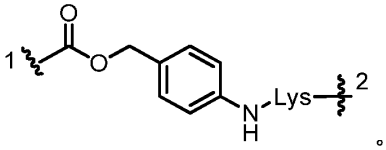
m_1、m_2、m_3和 m_4各自独立地为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；

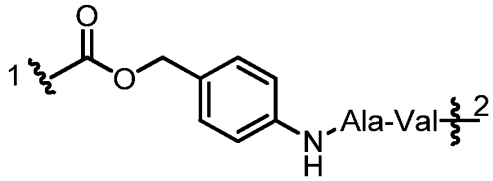
A，D 和 γ 如前文所述。

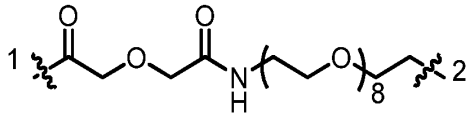
在一些实施方案中，式 (II) 或式 (III) 所示的抗体-药物缀合物中的 L_1为



；其中，Z_1为氨基酸或2-5个氨基酸组成的肽，其中所述氨基酸选自Lys、Cit、Val、D-Val、Phe、Leu、Gly、Ala和Asn；优选地，Z_1选自Cit、Lys、Cit-Val和Ala-Val。

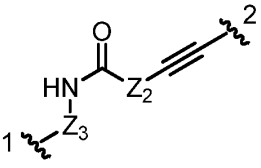
在一些实施方案中，L_1为  。

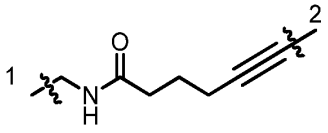
在一些实施方案中，L_1为  。

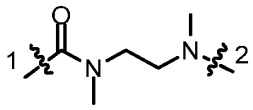
在一些实施方案中，式(II)所示的抗体-药物缀合物中的 L_2 为  ，且 m_1 为 1。

在一些实施方案中，式(II)或式(III)所示的抗体-药物缀合物中的 L_3 为 5-6 元杂芳环，且 m_2 为 1。

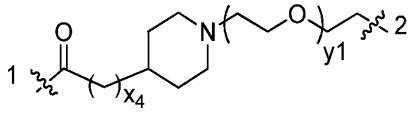
在一些实施方案中，L_3 为三氮唑，且 m_2 为 1。

在一些实施方案中，式(II)或式(III)所示的抗体-药物缀合物中的 L_4 为  ，其中 Z_2 为 C_{1-6} 亚烷基，Z_3 为 C_{1-6} 亚烷基；且 m_3 为 1。

在一些实施方案中，L_4 为  ，且 m_3 为 1。

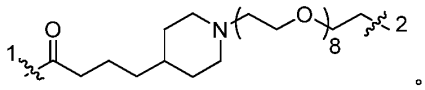
在一些实施方案中，式(III)所示的抗体-药物缀合物中的 L_1'为  。

在一些实施方案中，式(III)所示的抗体-药物缀合物中的 L_5 为



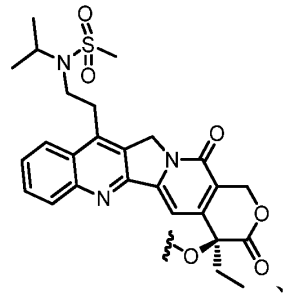
；其中，x_4 为 1、2、3、4、5 或 6；y_1 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在一些实施方案中，式(III)所示的抗体-药物缀合物中的 L_5 为

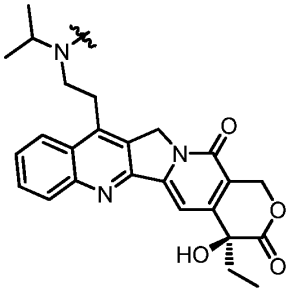


。

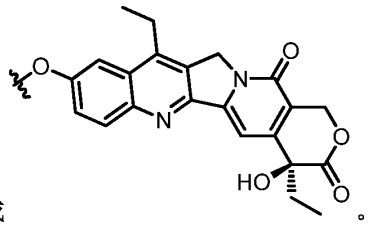
在一些实施方案中，式(I)所示的抗体-药物缀合物中的 D 为



、

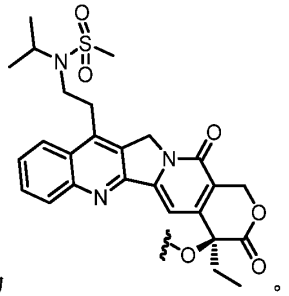


或



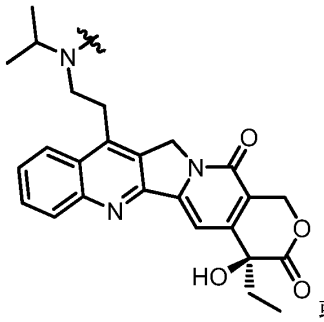
。

在一些实施方案中，式(II)所示的抗体-药物缀合物中的 D 为

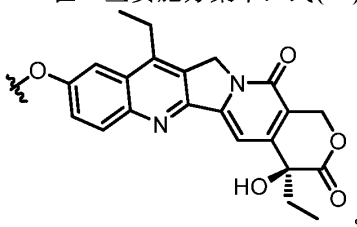


。

在一些实施方案中，式(III)所示的抗体-药物缀合物中的 D 为

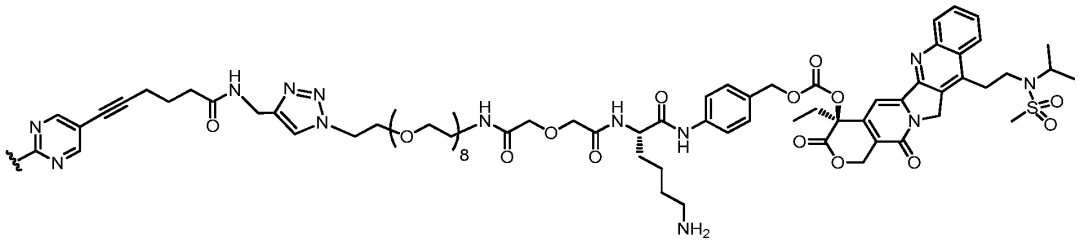


或



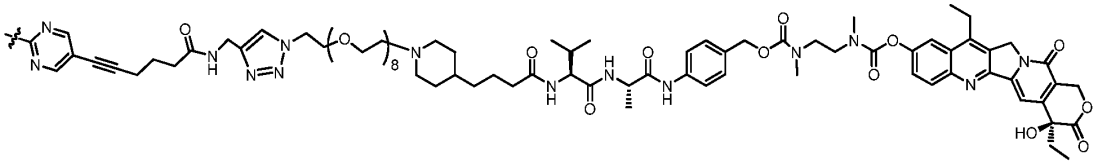
。

在一些实施方案中，式(II)所示的抗体-药物缀合物中 D-[L_1-$(L_2)_{m1}$-$(L_3)_{m2}$-$(L_4)_{m3}$-E]-为

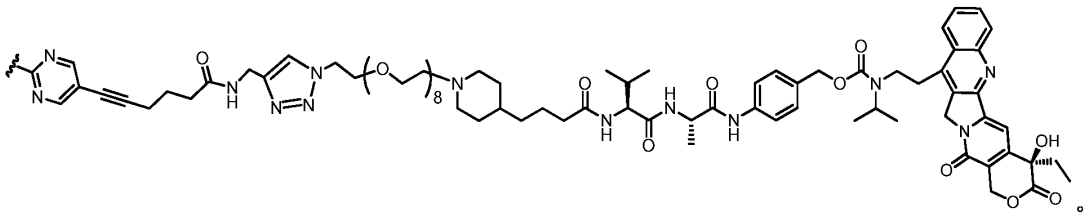


。

在一些实施方案中，式(III)所示的抗体-药物缀合物中 D-[$(L_1')_{m4}$-L_1-$(L_5)_{m5}$-$(L_3)_{m2}$-$(L_4)_{m3}$-E]-为

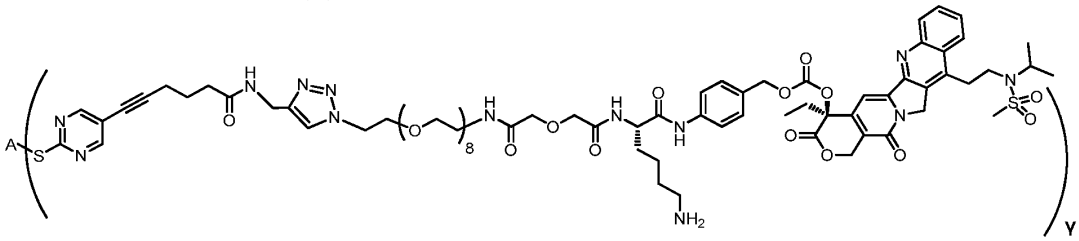


或



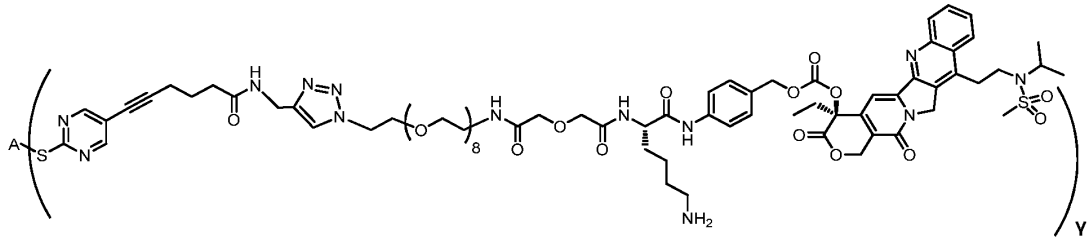
。

在一些实施方案中，式(II)所示的抗体-药物缀合物的结构为：



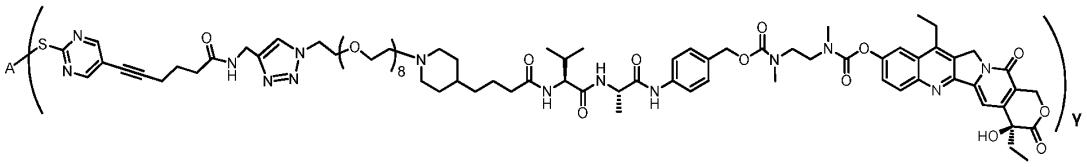
其中，γ 选自 1-10 之间的整数，例如 γ 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10，A 为前述特异性结合人 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，式(II)所示的抗体-药物缀合物如下式所示：



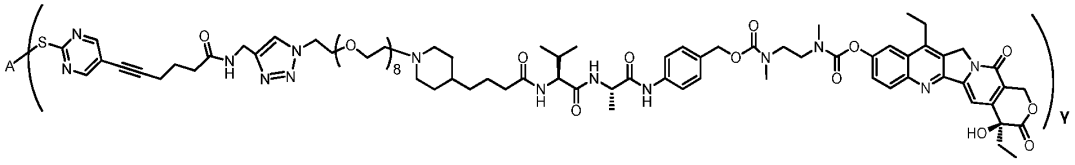
其中 γ 为 1~10 的整数，例如 γ 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10，A 为 2C6.9-hz21。

在一些实施方案中，式(III)所示的抗体-药物缀合物的结构为：



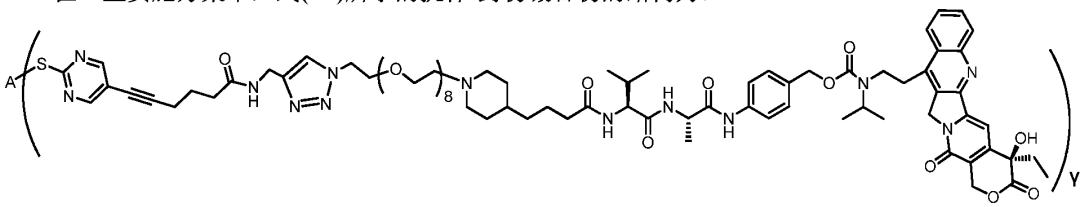
其中，γ选自1-10之间的整数，例如γ为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，A为前述特异性结合人CLDN18.2的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，式(III)所示的抗体-药物缀合物如下式所示：



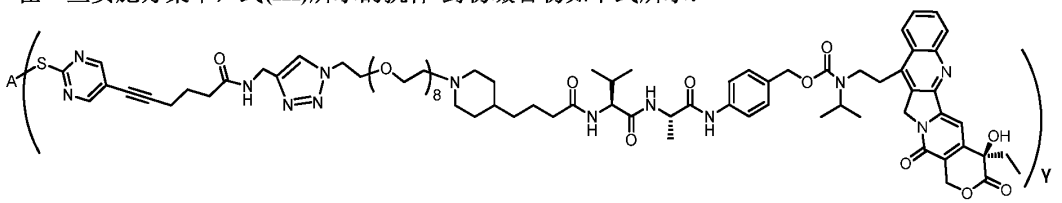
其中γ为1~10的整数，例如γ为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，A为2C6.9-hz21。

在一些实施方案中，式(III)所示的抗体-药物缀合物的结构为：



其中，γ选自1-10之间的整数，例如γ为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，A为前述特异性结合人CLDN18.2的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，式(III)所示的抗体-药物缀合物如下式所示：



其中γ为1~10的整数，例如γ为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，A为2C6.9-hz21。

本发明还提供一种组合物，其含有一个或多个上述的抗体-药物缀合物，所述组合物中的生物活性分子片段（即式(I)中所述的D）与特异性结合CLDN18.2的抗体或其抗原结合片段（即式(I)中所述的A）的摩尔比（DAR值）为1-10之间的小数或整数（例如1-8之间的小数或整数，例如1.0, 1.5, 2.0, 2.5，3.0，3.1，3.2，3.3，3.4，3.5，3.6，3.7，3.79，3.8，3.9，4.0，4.1，4.2，4.3，4.4，4.5，4.6，4.7，4.8，4.9，5.0，5.1，5.2，5.3，5.4，5.5，5.6，5.7，5.8，5.9，6.0，6.1，6.2，6.3，6.4，6.5，6.6，6.7，6.8，6.9，6.95，7.0，7.03，7.1，7.12，7.2，7.3，7.40，7.5，7.6，7.7，7.8，7.9或8.0）。

DAR值又称为抗体药物偶联比，其是指平均每个抗体所连接的（D-L）的数量，其可以通过本领域已知方法进行测定和计算。例如通过LC-MS、HIC等测定抗体和（D-L）偶联后的分子量，分别计算偶联不同数量（D-L）的轻链和重链的比例，并通过公式DAR=（轻链DAR1*1+…+轻链

$DARn_1*n_1$）*2+（重链 DAR1*1+…+$DARn_2*n_2$）*2 计算得出 DAR 值；其中 $DARn_1$ 表示偶联 n_1 个（D-L）的轻链占轻链部分的比例，$DARn_2$ 表示偶联 n_2 个（D-L）的重链占重链部分的比例。

在一些实施方案中，所述组合物中进一步含有前文所述的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述组合物中含有 2C6.9-TL001。在一些实施方案中，所述组合物为 2C6.9-TL001。

在一些实施方案中，所述组合物中含有 2C6.9-TL002。在一些实施方案中，所述组合物为 2C6.9-TL002。

在一些实施方案中，所述组合物中含有 2C6.9-TL003。在一些实施方案中，所述组合物为 2C6.9-TL003。

本发明的抗体或其抗原结合片段可进行衍生化，例如被连接至另一个分子（例如另一个多肽或蛋白）。通常，抗体或其抗原结合片段的衍生化（例如，标记）不会不利影响其对 CLDN18.2（特别是人 CLDN18.2）的结合。因此，本发明的抗体或其抗原结合片段还意欲包括此类衍生化的形式。

一种类型的衍生化抗体（例如，双特异性抗体）是通过交叉连接 2 个或多个抗体（属于同一类型或不同类型）而产生的。获得双特异性抗体的方法是本领域公知的，其实例包括但不限于，化学交联法、细胞工程法（杂交杂交瘤法）或基因工程法。

另一种类型的衍生化抗体是标记的抗体。例如，可以将本发明的抗体或其抗原结合片段连接至可检测的标记。本发明所述的可检测的标记可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学或化学手段检测的任何物质。这类标记是本领域熟知的，其实例包括但不限于，酶（例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶，等）、放射性核素（例如，3H、125I、35S、14C 或 32P）、荧光染料（例如，异硫氰酸荧光素（FITC）、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明（TRITC）、藻红蛋白（PE）、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物（例如 Cy7、Alexa 750））、吖啶酯类化合物、磁珠（例如，Dynabeads®）、测热标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料（例如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶，等）珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲和素（例如，链霉亲和素）的生物素。教导该标记物的使用的专利包括，但不限于，美国专利 3,817,837；3,850,752；3,939,350；3,996,345；4,277,437；4,275,149；及 4,366,241（全部通过引用并入本文）。如上所述的可检测的标记可通过本领域已知的方法检测。例如，放射性标记可使用摄影胶片或闪烁计算器检测，荧光标记物可使用光检测器检测，以检测发射的光。酶标记物一般通过给酶提供底物及检测通过酶对底物的作用产生的反应产物来检测，及测热标记物通过简单可视化着色标记物来检测。在某些实施方案中，此类标记能够适用于免疫学检测（例如，酶联免疫测定法、放射免疫测定法、荧光免疫测定法、化学发光免疫测定法等）。在某些实施方案中，可通过不同长度的接头（linker）将如上所述的可检测的标记连接至本发明的抗体或其抗原结合片段，以降低潜在的位阻。

在某些实施方案中，本发明的抗体-药物缀合物中包含的抗体或其抗原结合片段为一种或一种以上前述衍生化抗体或其抗原结合片段。

治疗方法和药物组合物

在另一个方面，本发明还提供了药物组合物。

在一些实施方案中，所述药物组合物含有一个或多个上述的抗体-药物缀合物或组合物。

在一些优选地实施方案中，所述药物组合物进一步包含药学上可接受的载体和/赋形剂。

在一些优选地实施方案中，所述药物组合物还包含其它具有抗肿瘤活性的成分。在一些实施方案中，所述抗体-药物缀合物或组合物与其它具有抗肿瘤活性的成分在同一制剂单元中，或者在不同的制剂单元中。因此，本发明的抗体-药物缀合物或组合物与其它具有抗肿瘤活性的成分可以同时、分开或相继施用。

在一些实施方案中，所述其它具有抗肿瘤活性的成分是生物活性多肽或其活性片或化疗药物。在一些实施方案中，所述生物活性多肽选自免疫检查点抑制剂（例如，**PD-1** 抗体、**PD-L1** 抗体、**CTLA-4** 抗体、**LAG-3** 抗体），或细胞因子（例如，干扰素、**IL-2**、**IL-15**、**GM-CSF**、**IL-7**、**IL-12**、**IL-18**、**IL-21**）。在一些实施方案中，所述化疗药物选自表柔比星、奥沙利铂、卡培他滨、**5-**氟尿嘧啶、亚叶酸、紫杉醇和白蛋白结合型紫杉醇中的一种或多种。在一些实施方案中，所述其它具有抗肿瘤活性的成分为表柔比星、奥沙利铂和 **5-**氟尿嘧啶的组合，或奥沙利铂、亚叶酸和 **5-**氟尿嘧啶的组合。

在另一个方面，本发明的药物组合物中的抗体-药物缀合物或组合物足以在受试者中：

(a) 诱导肿瘤细胞（尤其是胃癌细胞，例如胃腺癌细胞）凋亡；

(b) 抑制肿瘤细胞（尤其是胃癌细胞，例如胃腺癌细胞）增殖；

(c) 诱发和/或增加补体依赖性细胞毒活性；

(d) 诱发和/或增加抗体依赖性细胞毒活性；

(e) 抑制 **CLDN18.2** 的表达和活化；

(f) 抑制 **CLDN18.2** 介导的信号传导；或

(g) (a)-(f)的任意组合。

在另一个方面，本发明提供所述的抗体-药物缀合物、所述组合物、药物组合物在制备预防和/或治疗和/或辅助治疗肿瘤的药物中的用途。

在一些实施方案中，所述肿瘤选自实体肿瘤、血液肿瘤和癌症的转移性、难治性或复发性病灶。

在一些实施方案中，所述肿瘤或癌症选自食管癌、胃肠癌、胃腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、结直肠癌、肾癌、肺癌（例如非小细胞肺癌）、肝癌、胃癌、胃食管交界处**(GEJ)**腺癌、头颈癌、膀胱癌、乳腺癌、子宫癌、宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、生殖细胞癌、骨癌、皮肤癌、胸腺癌、胆管癌、胆囊癌、黑素瘤、间皮瘤、淋巴瘤、骨髓瘤（例如多发性骨髓瘤）、肉瘤、神经胶质母细胞瘤、白血病。

在一些实施方案中，所述肿瘤选自胃癌、胃腺癌、胃食管交界处**(GEJ)**腺癌、食管癌、胃肠癌、胰腺癌、肺癌（例如非小细胞肺癌）。

在一些实施方案中，所述肿瘤为胃癌、胃腺癌或胃食管交界处**(GEJ)**腺癌，例如局部晚期不可切除或转移的胃癌、胃腺癌或胃食管交界处**(GEJ)**腺癌。

在一些实施方案中，所述肿瘤为 **CLDN18.2** 阳性，进一步，所述肿瘤为 **HER2** 阴性。

在一些实施方案中，所述肿瘤为 **HER2** 阴性。

在另一个方面，本发明提供了一种在受试者中预防和/或治疗肿瘤的方法。在另一个方面，本发明提供了一种在受试者中延迟肿瘤进展的方法。在另一个方面，本发明提供了一种在受试者中降低或抑制肿瘤复发的方法。以上所述方法包括向有此需要的受试者施用有效量的本发明所述的抗体-药物缀合物、组合物或药物组合物。

在一些实施方案中，以上所述方法还包括向所述受试者施用第二疗法，所述第二疗法选自手术、化疗、放疗、免疫疗法、基因疗法、DNA 疗法、RNA 疗法、纳米疗法、病毒疗法、辅助疗法及其任意组合。

在一些实施方案中，所述第二疗法可以与以上所述的方法分开或联合应用；或，所述第二疗法可以与以上所述的方法分开或联合应用同时或相继应用。

在一些实施方案中，所述第二疗法为化疗。在一些实施方案中，所述化疗的药物选自表柔比星、奥沙利铂、卡培他滨、5-氟尿嘧啶、亚叶酸、紫杉醇和白蛋白结合型紫杉醇中的一种或多种。在一些实施方案中，所述化疗的药物为表柔比星、奥沙利铂和5-氟尿嘧啶的组合，或奥沙利铂、亚叶酸和5-氟尿嘧啶的组合。在一些实施方案中，奥沙利铂、亚叶酸和5-氟尿嘧啶的组合给药方案选自FOLFOX4、FOLFOX6或m FOLFOX6。

在一些实施方案中，所述第二疗法为免疫疗法。在一些实施方案中，所述免疫疗法的药物选自免疫检查点抑制剂（例如，PD-1抗体、PD-L1抗体、CTLA-4抗体、LAG-3抗体），或细胞因子（例如，干扰素、IL-2、IL-15、GM-CSF、IL-7、IL-12、IL-18、IL-21）。

在一些实施方案中，所述肿瘤选自实体肿瘤、血液肿瘤，和癌症的转移性、难治性或复发性病灶。

在一些实施方案中，所述肿瘤或癌症选自食管癌、胃肠癌、胃腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、结直肠癌、肾癌、肺癌（例如非小细胞肺癌）、肝癌、胃癌、胃食管交界处(GEJ)腺癌、头颈癌、膀胱癌、乳腺癌、子宫癌、宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、生殖细胞癌、骨癌、皮肤癌、胸腺癌、胆管癌、胆囊癌、黑素瘤、间皮瘤、淋巴瘤、骨髓瘤（例如多发性骨髓瘤）、肉瘤、神经胶质母细胞瘤、白血病。

在一些实施方案中，所述肿瘤选自胃癌、胃腺癌、胃食管交界处(GEJ)腺癌、食管癌、胃肠癌、胰腺癌和肺癌（例如非小细胞肺癌）。

在一些实施方案中，所述肿瘤为胃癌、胃腺癌或胃食管交界处(GEJ)腺癌，例如局部晚期不可切除或转移的胃癌、胃腺癌或胃食管交界处(GEJ)腺癌。

在一些实施方案中，所述肿瘤为 CLDN18.2 阳性，进一步，所述肿瘤为 HER2 阴性。

在一些实施方案中，所述肿瘤为 HER2 阴性。

本发明的抗体-药物缀合物、组合物或药物组合物可以配制成医学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、锭剂、栓剂、注射剂（包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液）、吸入剂、喷雾剂等。优选剂型取决于预期的给药方式和治疗用途。本发明的药物组合物应当是无菌的并在生产和储存条件下稳定。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。例如，可通过下述方法来制备无菌注射溶液：在适当的溶剂中掺入必需剂量的抗体-药物缀合物或组合物，以及任选地，同时掺入其它期望的成分(包括但不限于，pH 调

节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，等渗剂、防腐剂、稀释剂，或其任何组合)，随后过滤除菌。此外，可以将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂(例如，通过真空干燥或冷冻干燥)以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中，例如无菌无热原水。

此外，本发明的抗体-药物缀合物可以以单位剂量形式存在于药物组合物中，以便于施用。

本发明的抗体-药物缀合物、组合物或药物组合物可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用，包括但不限于，口服、口腔、舌下、眼球、局部、肠胃外、直肠、叶鞘内、内胞浆网槽内、腹股沟、膀胱内、局部（如，粉剂、药膏或滴剂），或鼻腔途径。但是，对于许多治疗用途而言，优选的给药途径/方式是胃肠外给药（例如静脉注射，皮下注射，腹膜内注射，肌内注射）。技术人员应理解，给药途径和/或方式将根据预期目的而发生变化。在一个优选的实施方案中，本发明的抗体-药物缀合物、组合物或药物组合物通过静脉输注或注射给予。

本发明的药物组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的抗体-药物缀合物或组合物。“预防有效量”是指，足以预防，阻止，或延迟疾病的发生的量。“治疗有效量”是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。本发明的抗体-药物缀合物或组合物的治疗有效量可根据如下因素发生变化：待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其它治疗等等。

在本发明中，可调整给药方案以获得最佳目的反应（例如治疗或预防反应）。例如，可以单次给药，可以在一段时间内多次给药，或者可以随治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。

本发明的抗体-药物缀合物或组合物的治疗或预防有效量的典型非极限范围是**0.02～100mg/kg**，例如 **0.1～100mg/kg**，**0.1～50mg/kg**，或 **1～50mg/kg**。应注意的是，剂量可随需要治疗的症状的类型和严重性不同而发生变化。此外，本领域技术人员理解，对于任一特定患者，特定的给药方案应根据患者需要和医生的专业评价而随时间调整；此处给出的剂量范围只用于举例说明目的，而不限定本发明药物组合物的使用或范围。

在本发明中，所述受试者可以为哺乳动物，例如人。

缩略词

CDR	免疫球蛋白可变区中的互补决定区
FR	抗体构架区：抗体可变区中除CDR残基以外的氨基酸残基
VH	抗体重链可变区
VL	抗体轻链可变区
IgG	免疫球蛋白G
AbM	AbM CDR定义方式来源于Martin的相关研究（Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA 86:9268–9272），此定义方法整合了Kabat及Chothia两者的部分定义。
Kabat	由Elvin A. Kabat提出的免疫球蛋白比对及编号系统 (参见，例如Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service,

	National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)。
Chothia	由Chothia等人提出的免疫球蛋白编号系统，其是基于结构环区的位置鉴定CDR区边界的经典规则(参见，例如Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia等人 (1989) Nature 342:878-883)。
IMGT	基于由Lefranc等人发起的国际免疫遗传学信息系统 (The international ImMunoGeneTics information system ® (IMGT))的编号系统，可参阅Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003。
mAb	单克隆抗体
EC50	产生50%功效或结合的浓度
HRP	辣根过氧化物酶
CDR-H1	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区1
CDR-H2	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区2
CDR-H3	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区3
CDR-L1	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区1
CDR-L2	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区2
CDR-L3	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区3

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、生物化学、核酸化学、免疫学等实验操作除非特殊说明为相应领域内常规使用的操作。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，术语“偶联物”或“缀合物”可以互换，指的是生物活性分子通过连接子与抗体连接得到的物质，英文名称为 ADC（antibody-drug conjugate）。

所述连接子可以通过各种化学键与抗体连接。例如，在一些实施方式中，所述连接子通过与抗体的巯基形成硫醚键相连接。在一些具体 ADC 分子（如 2C6.9-TL001、2C6.9-TL002、或 2C6.9-TL003 中的 ADC 分子）结构式中的-S-仅表示连接子与抗体的巯基形成的硫醚键，并不代表-S-是连接子中的一部分。

本申请 ADC 的结构式可以以$(D\text{-}L)_\gamma\text{-}A$ 表示，其中，D 为生物活性分子片段；L 为连接子；A 为特异性结合人 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段；γ 选自 1-10 之间的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。γ 是指每一个抗体分子所连接的(D-L)的个数，其为整数。然而，在 ADC 制备过程中，各抗体分子可能连接不同数量的(D-L)，因此，一般而言，ADC 的产物是偶联了不同数量的(D-L)的抗体的组合物。在实践中，通常用 DAR 表示抗体所连接（D-L）数量的平均值。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指，通常由两对多肽链（每对具有一条轻链(LC)和一条重链(HC)）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ（kappa）和 λ（lambda）轻链。重链可分类为 μ、δ、γ、α 或 ε，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻

链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应子功能，如可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成抗原结合部位。氨基酸在各区域或结构域的分配可遵循 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))，或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883，或 AbM ，Martin 的相关研究（Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA 86:9268–9272）的定义。在本文中，除非上下文明确指出，否则当提及术语“抗体”时，其不仅包括完整抗体，而且包括抗体的抗原结合片段。

如本文中所使用的，术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区中负责抗原结合的氨基酸残基。这些氨基酸残基的精确边界可根据本领域已知的各种编号系统进行定义，例如可按照 Kabat 编号系统（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991）、Chothia 编号系统（Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883），IMGT 编号系统（Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003），或，Martin 的相关研究（Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA 86:9268–9272），此定义方法整合了 Kabat 及 Chothia 两者的部分定义，最早应用在 Oxford Molecular 抗体建模软件中（Martin A C R. Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains[M]//Antibody engineering. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010: 33-51.）中的定义。对于给定的抗体，本领域技术人员将容易地鉴别各编号系统所定义的 CDR。并且，不同编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的（例如，可参见 Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003）。

本发明的抗体或其抗原结合片段含有的 CDR 可根据本领域已知的各种编号系统确定。在某些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段含有的 CDR 优选地通过 IMGT 或 AbM 编号系统确定。

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

如本文中所使用的，术语抗体的“抗原结合片段”是指抗体的片段的多肽,例如全长抗体的片段的多肽，其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力，和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合，其也被称为“抗原结合部分”。通常参见，Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版，Raven Press, N.Y. (1989)，其以其全文通过引用合并入本文，用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。抗原结合片段的非限制性实例包括 Fab、Fab’、$F(ab')_2$、Fd、Fv、dAb 和互补决定区(CDR)片段、单链抗体（例如，scFv）、嵌合抗体、双抗体（diabody）、线性抗体（linear antibody）、纳米抗体（技术来自 Domantis）、结构域抗体（技术来自 Ablynx）、和这样的多肽，其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。工程改造的抗体变体综述

于 Holliger 等, 2005; Nat Biotechnol, 23: 1126-1136 中。

如本文中所使用的，术语“全长抗体”意指，由两条“全长重链”或“重链”和两条“全长轻链”或“轻链”组成的抗体。其中，“全长重链”或“重链”是指这样的多肽链，其在 N 端到 C 端的方向上由重链可变区（VH）、重链恒定区 CH1 结构域、铰链区（HR）、重链恒定区 CH2 结构域、重链恒定区 CH3 结构域组成；并且，当所述全长抗体为 IgE 同种型时，任选地还包括重链恒定区 CH4 结构域。优选地，“全长重链”是在 N 端到 C 端方向上由 VH、CH1、HR、CH2 和 CH3 组成的多肽链。“全长轻链”或“轻链”是在 N 端到 C 端方向上由轻链可变区(VL)和轻链恒定区（CL）组成的多肽链。两对全长抗体链通过在 CL 和 CH1 之间的二硫键和两条全长重链的 HR 之间的二硫键连接在一起。本发明的全长抗体可以来自单一物种，例如人；也可以是嵌合抗体或人源化抗体。本发明的全长抗体包含分别由 VH 和 VL 对形成的两个抗原结合部位，这两个抗原结合部位特异性识别/结合相同的抗原。

如本文中所使用的，术语“Fd 片段”意指由 VH 和 CH1 结构域组成的抗体片段；术语“dAb 片段”意指由 VH 结构域组成的抗体片段（Ward 等人, Nature 341:544 546 (1989)）；术语“Fab 片段”意指由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的抗体片段；术语“F(ab')2 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段；术语“Fab'片段”意指还原连接 F(ab')2 片段中两个重链片段的二硫键后所获片段，由一条完整的轻链和重链的 Fd 片段（由 VH 和 CH1 结构域组成）组成。

如本文中所使用的，术语“Fv 片段”意指由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域组成的抗体片段。Fv 片段通常被认为是，能形成完整的抗原结合位点的最小抗体片段。一般认为，六个 CDR 赋予抗体的抗原结合特异性。然而，即便是一个可变区（例如 Fd 片段，其仅仅含有三个对抗原特异的 CDR）也能够识别并结合抗原，尽管其亲和力可能低于完整的结合位点。

如本文中所使用的，术语“Fc 片段”意指，由抗体的第一重链的第二、第三恒定区与第二重链的第二、第三恒定区经二硫键结合而形成的抗体片段。抗体的 Fc 片段具有多种不同的功能，但不参与抗原的结合。

如本文中所使用的，术语“scFv”是指，包含 VL 和 VH 结构域的单个多肽链，其中所述 VL 和 VH 通过接头（linker）相连（参见，例如, Bird 等人, Science 242:423-426 (1988)；Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)；和 Pluckthun，The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第 113 卷， Roseburg 和 Moore 编，Springer-Verlag，纽约，第 269-315 页(1994)）。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH2-VL-接头-VH-COOH 或 NH2-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列(GGGGS)4 的接头，但也可使用其变体（Holliger 等人(1993)，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448）。可用于本发明的其它接头由 Alfthan 等人(1995)，Protein Eng. 8:725-731，Choi 等人(2001)，Eur. J. Immunol. 31: 94-106，Hu 等人(1996)，Cancer Res. 56:3055-3061，Kipriyanov 等人(1999)，J. Mol. Biol. 293:41-56 和 Roovers 等人(2001)，Cancer Immunol.描述。在一些情况下，scFv 的 VH 与 VL 之间还可以存在二硫键。如本文中所使用的，术语“di-scFv”是指，由两个 scFv 连接形成的抗体片段。

如本文中所使用的，术语“双抗体（diabody）”意指，其 VH 和 VL 结构域在单个多肽链上表达，但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位（参见，例如，Holliger P.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA

90:6444-6448 (1993)，和 Poljak R. J.等人, Structure 2:1121-1123 (1994))。

上述各个抗体片段均保持了特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力，和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合。

如本文中所使用的，“双特异性抗体”，指由第一抗体(片段)和第二抗体(片段)或抗体类似物通过偶联臂所形成的缀合物，偶联的方式包括但不限于化学反应、基因融合，蛋白融合，多肽融合和酶促。“多特异性抗体”包括例如：三特异性抗体和四特异性抗体，前者是具有三种不同抗原结合特异性的抗体，而后者是具有四种不同抗原结合特异性的抗体。

如本文中所使用的，“抗体类似物（antibody mimetics）”，指与抗体一样特异性结合抗原，但却没有抗体结构。它们通常是人工肽或蛋白质，摩尔质量约为 3 至 20kDa。例如，锚蛋白重复蛋白(DARPin)和 fynomer。经设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)，与 IgG 抗体，scFv-Fc 抗体片段相连或其组合，如 CN104341529A。抗 IL-17a 的 fynomer 与抗 IL-6R 抗体结合，如 WO2015141862A1。

在本文中，获得抗体的技术可使用本领域技术人员已知的常规技术（例如，重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法）从给定的抗体（例如本发明提供的抗体）获得抗体的抗原结合片段（例如，上述抗体片段），并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”、“单抗”、“mAb”具有相同的含义且可互换使用可互换，其是指，来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段，也即，除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。此外，修饰语“单克隆”仅表明该抗体的特征为从高度同源的抗体群中获得，不能理解为需要通过任何特定方法来制备所述抗体。

本发明的单克隆抗体可以通过多种技术进行制备，例如杂交瘤技术(参见，例如 Kohler 等人. Nature, 256:495 ,1975)，重组 DNA 技术（参见，例如美国专利申请 4,816,567)，或噬菌体抗体库技术（参见，例如 Clackson 等. Nature352 ： 624-628, 1991，或 Marks 等. J.Mol.Biol.222 ： 581-597, 1991)。

例如，可以如下来制备单克隆抗体。首先用免疫原（必要时候添加佐剂）免疫注射小鼠或其它合适的宿主动物。免疫原或佐剂的注射方式通常为皮下多点注射或腹腔注射。可将免疫原预先偶联到某些已知蛋白，如血清白蛋白或大豆胰酶抑制剂上，以增强抗原在宿主内的免疫原性。佐剂可以是弗氏佐剂或 MPL-TDM 等。动物在接受免疫后，体内将产生分泌特异性结合免疫原的抗体的淋巴细胞。另外，淋巴细胞也可以利用体外免疫获得。收集目的淋巴细胞，并用合适的融合剂，如 PEG，使其与骨髓瘤细胞融合以获得杂交瘤细胞（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103, Academic Press, 1996)。上述制备的杂交瘤细胞可以接种到合适的培养液中生长，培养液中优选含有一种或多种能够抑制未融合的、母体骨髓瘤细胞生长的物质。例如，对于缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸转移酶(HGPRT 或 HPRT)的母体骨髓瘤细胞，在培养液中添加次黄嘌呤、氨基喋呤和胸腺嘧啶(HAT 培养基)等物质将可以抑制 HGPRT-缺陷细胞的生长。优选的骨髓瘤细胞应该具有融合率高，抗体分泌能力稳定，对 HAT 培养液敏感等特征。其中，骨髓瘤细胞首选鼠源骨髓瘤，如 MOP-21 或 MC-11 小鼠肿瘤衍生株(THE Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA)，和 SP-2/0 或 X63-Ag8-653 细胞株(American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA)。另外也有研究报道，利用人骨髓瘤和

人鼠异源骨髓瘤细胞株制备人单抗(Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。生长杂交瘤细胞的培养液用于检测针对特异抗原的单抗的产生。测定杂交瘤细胞产生的单抗的结合特异性的方法包括例如，免疫沉淀或体外结合试验，如放射免疫试验(RIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)。例如，可利用 Munson 等在 Anal. Biochem. 107: 220 (1980)描述的 Scatchard 分析法来测定单抗的亲和力。当确定了杂交瘤产生的抗体的特异性、亲和力和反应性之后，目的细胞株可以通过(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1996)所描述的标准的有限稀释法进行亚克隆化。合适的培养液可以是 DMEM 或 RPMI-1640 等。另外，杂交瘤细胞还可以腹水瘤的形式在动物体内生长。利用传统的免疫球蛋白纯化方法，如蛋白 A 琼脂糖凝胶、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析等，可以将亚克隆细胞分泌的单抗从细胞培养液、腹水或血清中分离出来。

还可以通过基因工程重组技术获得单克隆抗体。利用特异性结合单抗重链和轻链基因的核酸引物进行 PCR 扩增，可以从杂交瘤细胞中分离得到编码单抗重链和轻链基因的 DNA 分子。将所得的 DNA 分子插入表达载体内，然后转染宿主细胞（如 E. coli 细胞、COS 细胞、CHO 细胞、或其它不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞），并在合适的条件下进行培养，可以获得重组表达的目标抗体。

抗体可通过公知的技术，例如使用蛋白 A 或蛋白 G 的亲和层析进行纯化。随后或作为替代，可将特异性抗原（该抗体识别的靶分子）或其抗原表位固定在柱上，并通过免疫亲合层析法来纯化免疫特异性抗体。免疫球蛋白的纯化可参考例如 D.Wilkinson (The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia Pa., Vol.14, No.8 (Apr.17, 2000), pp.25-28)。

如本文中所使用的，术语“鼠源抗体”是指，来源于免疫接种过的小鼠的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，继而筛选出既能无限增殖又能分泌抗体的鼠杂交融合细胞，进而进行筛选、抗体制备和抗体纯化。或者由于抗原侵入小鼠体后 B 细胞分化增殖而形成浆细胞，浆细胞可产生分泌抗体。由特异性抗原刺激产生，抗体的产生是由于抗原侵入人体后引起各种免疫细胞相互作用，使淋巴细胞中的 B 细胞分化增殖而形成浆细胞，浆细胞可产生分泌抗体。

如本文中所使用的，术语“嵌合抗体（Chimeric antibody）”是指，这样的抗体，其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体（其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类），且轻链或/和重链的另一部分源自另一个抗体（其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类），但无论如何，其仍保留对目标抗原的结合活性（U.S.P 4,816,567 to Cabilly et al.; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 6855 (1984)）。例如，术语“嵌合抗体”可包括这样的抗体（例如人鼠嵌合抗体），其中抗体的重链和轻链可变区来自第一抗体（例如鼠源抗体），而抗体的重链和轻链可变区来自第二抗体（例如人抗体）。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，经基因工程改造的非人源抗体，其氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。通常而言，人源化抗体的全部或部分 CDR 区来自于非人源抗体（供体抗体），全部或部分的非 CDR 区（例如，可变区 FR 和/或恒定区）来自于人源免疫球蛋白（受体抗体）。人源化抗体通常保留了供体抗体的预期性质，包括但不限于，抗原特异性、亲和性、反应性、提高免疫细胞活性的能力、增强免疫应答的能力等。供体抗体可以是有预期性质（例如，抗原特异性、亲和性、反应性、提高免疫细胞活性的能力和/或增强免疫应答的能力）的小鼠、大鼠、兔或非人灵长

类动物（例如，食蟹猴）抗体。

人源化抗体既能够保留非人源供体抗体（例如鼠源抗体）的预期性质，又能够有效降低非人源供体抗体（例如鼠源抗体）在人受试者中的免疫原性，因此，是特别有利的。然而，由于供体抗体的 CDR 与受体抗体的 FR 之间的匹配问题，人源化抗体的预期性质（例如，抗原特异性、亲和性、反应性、提高免疫细胞活性的能力和/或增强免疫应答的能力）通常低于非人源供体抗体（例如鼠源抗体）。

因此，尽管本领域的研究人员已对抗体的人源化展开了深入的研究，并取得了一些进展（参见例如，**Jones et al., Nature, 321:522 525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323 329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593 596 (1992); and Clark, Immunol. Today 21: 397 402 (2000)**），但是，如何对某一供体抗体进行充分的人源化，以使得所产生的人源化抗体既具有尽可能高的人源化程度，又能够尽可能地保留供体抗体的预期性质，现有技术并没有提供详尽的指导。技术人员需要针对具体供体抗体进行摸索、探究和改造，付出大量的创造性劳动才有可能获得，既具有高人源化程度（例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%的人源化程度）、又保留具体供体抗体的预期性质的人源化抗体。

在本发明中，为了使人源化抗体尽可能保留供体抗体的性质（包括例如，抗原特异性、亲和性、反应性、提高免疫细胞活性的能力和/或增强免疫应答的能力），本发明的人源化抗体中构架区(FR)可以既包含人源受体抗体的氨基酸残基，也包含相应的非人源供体抗体的氨基酸残基。

本发明的人源化抗体可以根据上述制备的鼠单克隆抗体的序列进行制备。编码重链和轻链的 DNA 可以从目标鼠杂交瘤中获得，并且使用标准分子生物学技术进行工程改造以包含非鼠（例如人）免疫球蛋白序列。

为制备嵌合抗体，可使用本领域已知的方法将鼠免疫球蛋白可变区连接至人免疫球蛋白恒定区（参见例如 Cabilly 等人的美国专利 No.4,816,567）。例如，将编码 VH 的 DNA 可操作的连接至编码重链恒定区的另一 DNA 分子以获得全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的（参见例如 Kabat, E.A.等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242），包含这些区的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增获得。重链恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区，但是通常优选为 IgG1 或 IgG4 恒定区。例如，将编码 VL 的 DNA 可操作的连接至编码轻链恒定区 CL 的另一 DNA 分子以获得全长轻链基因（以及 Fab 轻链基因）。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的（参见例如 Kabat，E.A. 等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest，Fifth Edition，U.S.Department of Health and Human Services，NIH Publication No.91-3242），包含这些区的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增获得。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区，但通常优选为 κ 恒定区。

为制备人源化抗体，可以使用本领域已知的方法将鼠 CDR 区插入人源框架序列（参见 Winter 的美国专利 No.5,225,539；Queen 等人的美国专利 Nos.5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 和 6,180,370；以及 Lo, Benny, K.C., editor, in Antibody Engineering: Methods and Protocols, volume 248, Humana Press, New Jersey, 2004）。或者，还可以利用转基因动物，其能够在免疫后不产生内源性免疫球蛋白、并且能够产生完整人抗体库。例如，已有报道在嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区 (JH)基因的纯合缺失

可以完全抑制了内源性抗体产生，然后将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到所述种系突变小鼠中将导致该小鼠在遇到抗原刺激时产生人抗体（参见例如，Jakobovits 等，1993，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 ：2551 ；Jakobovits 等，1993，Nature362 ：255-258 ；Bruggermann 等，1993，Year in Immunology 7 ：33 ；和 Duchosal 等，1992，Nature 355 ：258）。上述转基因动物的非限制性实例包括，HuMAb 小鼠（Medarex,Inc.），其含有编码未重排的人重链（μ 和 γ）和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微型基因座（miniloci），加之使内源 μ 和 κ 链基因座失活的靶向突变（参见例如 Lonberg 等人(1994) Nature 368(6474):856-859）；或携带人重链转基因和人轻链转染色体的“KM 小鼠 TM”（参见专利申请 WO02/43478）。其它抗体人源化改造的方法还包括噬菌体展示技术（Hoogenboom 等，1991，J.Mol.Biol.227 ：381 ；Marks 等，J.Mol.Biol.1991，222 ：581-597 ；Vaughan 等，1996，Nature Biotech 14 ：309）。

如本文中所使用的，术语“人源化程度”是用于评价人源化抗体中非人源氨基酸残基的数量的指标。人源化抗体的人源化程度例如可通过 IMGT 网站 DomainGapAlign 来预测可变区序列与人 V 结构域的同源性。

如本文中所使用的，“同源抗体”指抗体的变体，其包含的重链和轻链可变区所包含的氨基酸序列与本文中所提供的抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列同源，且其中所述变体保留了本发明抗 CLDN18.2 抗体的期望的功能特性。

用于比较的序列比对方法在本领域是熟知的。多种程序和比对算法描述于：Smith TF 和 Waterman MS, Adv. Appl. Math., 2:482, 1981; Higgins DG 和 Sharp PM, CABIOS5:151, 1989。Altschul SF 等, Nature Genet., 6:119, 1994 提供了序列比对方法和同源性计算的详细思路。

如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。特异性结合相互作用的强度或亲和力可以该相互作用的平衡解离常数(KD)或半最大效应浓度（EC50）表示。

两分子间的特异性结合性质可使用本领域公知的方法进行测定。一种方法涉及测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速度。“结合速率常数”（ka 或 kon）和“解离速率常数”（kdis 或 koff）两者都可通过浓度及缔合和解离的实际速率而计算得出（参见 Malmqvist M, Nature,1993, 361:186-187）。kdis/kon 的比率等于解离常数 KD（参见 Davies 等人, Annual Rev Biochem, 1990; 59:439-473）。可用任何有效的方法测量 KD、kon 和 kdis 值。在某些实施方案中，可以使用生物发光干涉测量法（例如 ForteBio Octet 法）来测量解离常数。除此以外还可用表面等离子共振技术（例如 Biacore）或 Kinexa 来测量解离常数。

如本文中所使用的，术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时(例如，两个 DNA 分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据，或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据)，那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目×100 的函数。例如，如果两个序列的 10 个位置中有 6 个匹配，那么这两个序列具有 60%的同一性。例如，DNA 序列 CTGACT 和 CAGGTT 共有 50%的同一性(总共 6 个位置中有 3 个位置匹配)。通常，在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。这样的比对可通过使用，例如，可

通过计算机程序例如 Align 程序(DNAstar, Inc.)方便地进行的 Needleman 等人(1970)J. Mol. Biol. 48：443-453 的方法来实现。还可使用已整合入 ALIGN 程序(版本 2.0)的 E. Meyers 和 W. Miller (Comput. Appl Biosci.，4:11-17 (1988))的算法，使用 PAM120 权重残基表(weight residue table)、12 的缺口长度罚分和 4 的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外，可使用已整合入 GCG 软件包(可在 www.gcg.com 上获得)的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch (J MoI Biol. 48:444-453 (1970))算法，使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵以及 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重(gap weight)和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。

如本文中所使用的，术语“保守置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换，通过保守置换氨基酸得到的抗体的变体保留其来源序列的生物学活性，如特异性地与 CLDN18.2 结合。例如，可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和 PCR 介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换，例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似(例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质，包括形成共价键或氢键的能力等)的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、β 分支侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此，优选用来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见，例如，Brummell 等人，Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi 等人 Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); 和 Burks 等人 Proc. Natl Acad. Set USA 94:412-417 (1997)，其通过引用并入本文)。

本文涉及的二十个常规氨基酸的编写遵循常规用法。参见例如，Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates , Sunderland, Mass. (1991))，其以引用的方式并入本文中。在本发明中，术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

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

胶，SPGA，糖类（如山梨醇，甘露醇，淀粉，蔗糖，乳糖，葡聚糖，或葡萄糖），氨基酸（如谷氨酸，甘氨酸），蛋白质（如干燥乳清，白蛋白或酪蛋白）或其降解产物（如乳白蛋白水解物）等。

如本文中所使用的，术语“预防”是指，为了阻止或延迟疾病或病症或症状（例如，肿瘤、感染或自身免疫性疾病）在受试者体内的发生而实施的方法。

如本文中所使用的，术语“治疗”是指，为了获得有益或所需临床结果而实施的方法。为了本发明的目的，有益或所需的临床结果包括但不限于，减轻症状、缩小疾病的范围、稳定（即，不再恶化）疾病的状态，延迟或减缓疾病的发展、改善或减轻疾病的状态、和缓解症状（无论部分或全部），无论是可检测或是不可检测的。此外，“治疗”还可以指，与期望的存活期相比（如果未接受治疗），延长存活期。

如本文中使用的，术语“受试者”是指哺乳动物，例如灵长类哺乳动物，例如人。在某些实施方式中，所述受试者（例如人）患有肿瘤、感染或自身免疫性疾病，或者，具有患有上述疾病的风险。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如，肿瘤、感染或自身免疫性疾病）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病（例如，肿瘤、感染或自身免疫性疾病）的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其它治疗等等。

如本文中所使用的，术语“免疫细胞”包括具有造血的起源并在免疫应答中起作用的细胞，例如淋巴细胞，例如 B 细胞和 T 细胞；天然杀伤细胞；髓样细胞，例如单核细胞、巨噬细胞、嗜曙红细胞、肥大细胞、嗜碱细胞和粒细胞。

如本文中所使用的，术语“免疫应答”是指，免疫细胞（例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞或粒细胞）以及由免疫细胞或肝脏所产生的可溶性大分子（包括抗体、细胞因子、以及补体）的作用，该作用导致对侵入性病原体、被病原体感染的细胞或组织、癌细胞、或者在自身免疫或病理炎症情况下的正常人类细胞或组织的选择性损害、破坏或将它们从人体中清除。在本发明中，术语“抗原特异性 T 细胞应答”指由 T 细胞产生的免疫应答，该应答产生于当该 T 细胞特异的抗原对该 T 细胞的刺激之时。由 T 细胞在抗原特异性刺激时产生的反应的非限制性实例包括 T 细胞的增殖以及细胞因子（例如 IL-2）的产生。

如本文中所使用的，术语“效应子功能（effector function）”是指，那些可归因于抗体 Fc 区（天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区）的生物学活性，且其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的例子包括但不限于：Fc 受体结合亲和性、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）、补体依赖的细胞毒性（CDC）、抗体依赖性细胞吞噬作用（ADCP）、细胞表面受体（例如 B 细胞受体）的下调、B 细胞活化、细胞因子分泌、抗体和抗原-抗体复合物的半衰期/清除率等。改变抗体的效应子功能的方法是本领域已知的，例如通过在 Fc 区引入突变来完成。

术语“癌症”“肿瘤”可互换使用，其是指以体内异常细胞的不受控生长为特征的一大类疾病。不受管制的细胞分裂可能导致恶性肿瘤或侵入邻近组织的细胞的形成，并可能通过淋巴系统或血流转移到身体的远端部位。癌症包括良性和恶性癌症以及休眠肿瘤或微转移。癌症也包括血液肿瘤，尤其是血

液学恶性肿瘤。

术语“血液学恶性肿瘤”包括淋巴瘤，白血病，骨髓瘤或淋巴恶性肿瘤，以及脾癌和淋巴结肿瘤。示例性淋巴瘤包括 B 细胞淋巴瘤和 T 细胞淋巴瘤。B 细胞淋巴瘤，包括例如霍奇金淋巴瘤。T 细胞淋巴瘤，包括例如皮肤 T 细胞淋巴瘤。血液学恶性肿瘤还包括白血病，例如继发性白血病或急性淋巴细胞性白血病。血液恶性肿瘤还包括骨髓瘤（例如多发性骨髓瘤）及其它血液学和/或 B 细胞或 T 细胞相关的癌症。

如本文中所使用的，术语“药学上可接受的”指当分子本体、分子片段或组合物适当地给予动物或人时，它们不会产生不利的、过敏的或其它不良反应。可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的具体示例包括糖类（如乳糖）、淀粉、纤维素及其衍生物、植物油、明胶、多元醇（如丙二醇）、海藻酸等。

在本文中，组合疗法包括将本发明涵盖抗体-药物缀合物、组合物或药物组合物与一种或多种第二疗法的治疗剂（例如化学治疗剂）或其它预防或治疗模式（例如，放疗）组合使用。

第二疗法示例性的治疗剂可包括化学治疗剂（例如有丝分裂抑制剂）、烷化剂（例如氮芥 Nitrogen Mustard）、抗代谢物（例如叶酸类似物）、天然产物（例如长春花生物碱 Vinca Alkaloid）、多种试剂（例如铂配位络合物）、激素和拮抗剂（例如肾上腺皮质类固醇）、免疫调节剂（例如溴匹立明 Bropirimine, Upjohn）等。其它抗癌治疗包括特异性靶向癌细胞的其它抗体。

在此类组合疗法中，各种治疗剂经常具有不同的互补作用机制，组合疗法可能导致协同效应。组合疗法包含影响免疫反应（例如增强或活化反应）之治疗剂及影响（例如抑制或杀死）肿瘤/癌细胞之治疗剂。组合疗法可降低抗药性癌细胞发生的可能性。组合疗法可允许试剂中的一种或多种试剂剂量减少，以减少或消除与试剂中之一或多种相关的不良作用。此类组合疗法可对潜在疾病、病症或病状具有协同的治疗或预防作用。

在本文中，“组合”包括可以分开施用的疗法，例如针对单独投药分开调配（例如，可以在套组中提供），及可以按单一调配物（亦即“共调配物”）一起施用的疗法。在一些实施方案中，本发明的抗体-药物缀合物、组合物或药物组合物可依次序施用。在其它实施方案中，抗体-药物缀合物、组合物或药物组合物可同时施用。本发明的抗体-药物缀合物可以与至少一种其它（活性）药剂以任何方式组合使用。

HER2 阴性指的是细胞表面没有大量的 HER2 蛋白，包括 IHC 1+，或 IHC 2+/FISH 阴性，还包括 IHC 0 至 1+及 IHC 1+至 2+的范围。

在本文中，术语“卤素”包括氟、氯、溴、碘。

在本文中，术语“C_{1-6}烷基”表示直链或支链的含有 1-6 个碳原子的烷基，包括例如“C_{1-4}烷基”、“C_{1-3}烷基”等，具体实例包括但不限于：甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、2-甲基丁基、新戊基、1-乙基丙基、正己基、异己基、3-甲基戊基、2-甲基戊基、1-甲基戊基、3,3-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、1,2-二甲基丙基等。

在本文中，术语“C_{1-6}亚烷基”表示含 1-6 个碳原子的直链或支链烷烃失去两个氢原子得到的二价基团，包括例如“C_{1-4}亚烷基”、“C_{1-3}亚烷基”等，具体实例包括但不限于：亚甲基、亚乙基、1,3-亚丙

基、1,4-亚丁基、1,5-亚戊基或1,6-亚己基等。

在本文中，术语“C_{2-10}烯基”是指含有至少一个双键且碳原子数为2-10的直链或支链的烯基，包括例如“C_{2-6}烯基”、“C_{2-4}烯基”等。其实例包括但不限于：乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、1,3-丁二烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊二烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1,4-己二烯基、环戊烯基、1,3-环戊二烯基、环己烯基、1,4-环己二烯基等。

在本文中，术语“C_{2-10}亚烯基”是指含有2-10个碳原子的烯烃失去两个氢原子得到的二价基团。包括例如“C_{2-8}亚烯基”、“C_{4-6}亚烯基”等。其实例包括但不限于：1,5-亚戊烯基、1,5-亚戊-2-烯基、1,6-亚己烯基等。

在本文中，术语“C_{2-10}炔基”是指含有至少一个三键且碳原子数为2-10的直链或支链的炔基，包括例如“C_{2-6}炔基”、“C_{2-4}炔基”等。其实例包括但不限于：乙炔基、丙炔基、2-丁炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-甲基-2-戊炔基、2-己炔基、3-己炔基、5-甲基-2-己炔基等。

在本文中，术语“C_{2-10}亚炔基”是指含有2-10个碳原子的炔烃失去两个氢原子得到的二价基团。包括例如“C_{2-8}亚炔基”、“C_{4-6}亚炔基”等。其实例包括但不限于：1,5-亚戊炔基、1,5-亚戊-2-炔基、1,6-亚己炔基等。

在本文中，术语“C_{1-6}烷氧基”是指具有C_{1-6}烷基-O-结构的基团，其中C_{1-6}烷基如前文中所定义。具体实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基等。

在本文中，术语“5-12元杂芳基”是指含有5-12个环成员的芳香环状基团，并且其中至少一个环成员为选自N、O和S的杂原子。具体实例包括但不限于5-10元杂芳基、5-10元含氮杂芳基、5-6元含氧杂芳基等，例如呋喃基、噻吩基、吡咯基、噻唑基、异噻唑基、噻二唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、咪唑基、吡唑基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、1,2,3-三嗪基、1,3,5-三嗪基、1,2,4,5-四嗪基等。

本发明并不限于本文所描述的特定方法学、方案、细胞系、载体、或试剂，因为它们可以有所变化。另外，本文所用的术语只用于描述特定实施方式的目的，而不是用于限定本发明的范围。

本文中（说明书及权利要求），单数形式“一个”、“一种”和“所述”，除非上下文中有清楚的不同的说明，包括其复数形式，例如"一个宿主细胞"包括多个这样的宿主细胞。另外中文中没有对应的英文单复数语法规则，一个名词的单复数需根据上下文或实际情况判断，因此，英译本中，一个名词前面加上了“one or more than one”很可能是正确的。

附图说明

图1A显示了HEK293T-Claudin 18.2单克隆稳定细胞系流式检测。

图1B显示了L929-Claudin 18.2单克隆稳定细胞系流式检测。

图1C显示了KATOIII-Claudin 18.2单克隆稳定细胞系流式检测。

图1D显示了NCI-N87-Claudin 18.2单克隆稳定细胞系流式检测。

图1E显示了HEK293T-Claudin 18.1单克隆稳定细胞系Western blot检测。

图 2 显示了 2C6.9-hz21、IMAB362 抗体亲和力检测（流式细胞技术）。

图 3 显示了 2C6.9-hz21、IMAB362 抗体亲和力检测（L929-Claudin 18.2 细胞）。

图 4 显示了通过流式细胞技术检测 2C6.9-hz21 抗体的特异性。

图 5 显示了 2C6.9-hz21、IMAB362 对 HEK293T-Claudin 18.2 细胞 CDC 杀伤活性测定。

图 6 显示了 2C6.9-hz21、IMAB362 抗体 ADCC 活性检测（HEK293T-Claudin 18.2 细胞）。

图 7 显示了 2C6.9-TL001（DAR：3.79）的 HPLC-SEC 检测图谱。

图 8 显示了 2C6.9-TL001（DAR：7.12）的 HPLC-SEC 检测图谱。

图 9 显示了 2C6.9-TL001（DAR：7.12）与细胞膜表面 Claudin 18.2 的亲和力检测结果。

图 10A 显示了 2C6.9-TL001（DAR：7.12）对 HEK293T-Claudin 18.2 细胞杀伤活性检测结果。

图 10B 显示了 2C6.9-TL001（DAR：3.79）对 HEK293T-Claudin 18.2 细胞杀伤活性检测结果。

图 10C 显示了 2C6.9-TL001（DAR：7.12）对 HEK293T-Claudin 18.1 细胞杀伤活性检测结果。

图 10D 显示了 2C6.9-TL002、2C6.9-TL003 对 HEK293T-Claudin 18.2 细胞杀伤活性检测结果。

图 10E 显示了 2C6.9-TL002、2C6.9-TL003 对 HEK293T-Claudin 18.1 细胞杀伤活性检测结果。

图 11A 显示了 2C6.9-TL001（DAR：7.12）对 NUGC-4 细胞杀伤活性检测结果。

图 11B 显示了 2C6.9-TL001（DAR：3.79）对 NUGC-4 细胞杀伤活性检测结果。

图 11C 显示了 2C6.9-TL002、2C6.9-TL003 对 NUGC-4 细胞杀伤活性检测结果。

图 12A 显示了 Balb/c Nude 小鼠皮下 NCI-N87-Claudin18.2 细胞移植瘤模型中各组小鼠肿瘤体积的变化情况（*：P<0.05；****：P<0.0001）。

图 12B 显示了 Balb/c Nude 小鼠皮下 NCI-N87-Claudin18.2 细胞移植瘤模型中各组小鼠体重的变化情况。

图 12C 显示了 2C6.9-TL001 与 2C6.9 单抗+化疗在 CDX 模型 11 天体内药效比较结果（****：P<0.0001）。

图 12D 显示了 2C6.9-TL001 与 2C6.9 单抗+化疗在 CDX 模型 21 天体内药效比较结果（****：P<0.0001）。

图 12E 显示了不同 DAR 值 2C6.9-TL001 在 CDX（NUGC-4）模型中 21 天各组小鼠肿瘤体积的变化情况（****：P<0.001）。

图 12F 显示不同 DAR 值 2C6.9-TL001 在 CDX（NUGC-4）模型中 21 天各组小鼠体重的变化情况。

图 12G 显示了 Balb/c Nude 小鼠皮下 HuPrime®胃癌 GA0006 PDX 模型中 17 天各组小鼠肿瘤体积的变化情况（****：P<0.0001）。

图 12H 显示了 Balb/c Nude 小鼠皮下 HuPrime®胃癌 GA0006 PDX 模型中 17 天各组小鼠体重的变化情况。

图 12I 显示了 Balb/c Nude 小鼠皮下 HuPrime®胃癌 GA0006 PDX 模型中 24 天各组小鼠肿瘤体积的变化情况（****：P<0.0001）。

图 12J 显示了 Balb/c Nude 小鼠皮下 HuPrime®胃癌 GA0006 PDX 模型中 24 天各组小鼠体重的变化情况。

图 12K 显示了 Balb/c Nude 小鼠皮下 NCI-N87-Claudin18.2 细胞移植瘤模型中各组小鼠肿瘤体积的变化情况（***：*P*<0.001；****：*P*<0.0001）。

图 12L 显示了 Balb/c Nude 小鼠皮下 NCI-N87-Claudin18.2 细胞移植瘤模型中各组小鼠体重的变化情况。

图 12M 显示了 Balb/c Nude 小鼠皮下 HEK293T-Claudin18.2 细胞移植瘤模型中各组小鼠肿瘤体积的变化情况（**：*P*<0.01；****：*P*<0.0001）。

图 12N 显示了 Balb/c Nude 小鼠皮下 HEK293T-Claudin18.2 细胞移植瘤模型中各组小鼠体重的变化情况。

图 12O 显示了 Balb/c Nude 小鼠皮下 NUGC-4 细胞移植瘤模型中各组小鼠肿瘤体积的变化情况（****：*P*<0.0001）。

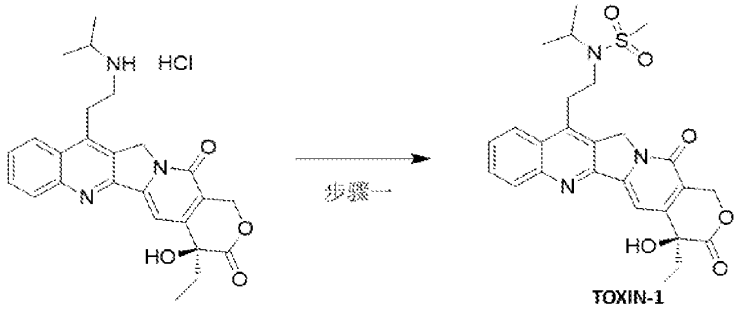
图 12P 显示了 Balb/c Nude 小鼠皮下 NUGC-4 细胞移植瘤模型中各组小鼠体重的变化情况。

图 13 显示了 2C6.9-TL001（DAR：7.40）的 HPLC-SEC 检测图谱。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。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。

实施例一 生物活性分子（TOXIN-1）的合成



将甲磺酰氯(462 mg, 12.77 mmol，纯度 70%左右)滴加入盐酸贝洛替康(3 g, 6.38 mmol)和三乙胺(2.58 g, 25.54 mmol)的二氯甲烷(40 mL)溶液中，室温条件下反应 2 h。抽滤，滤饼用二氯甲烷(3 mL)洗三次，得到 2.2 g 的(S)-N-(2-(4-乙基-4-羟基-3,14-二酮-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)乙基)-N-异丙基甲磺酰胺（TOXIN-1）。

结构表征数据如下：

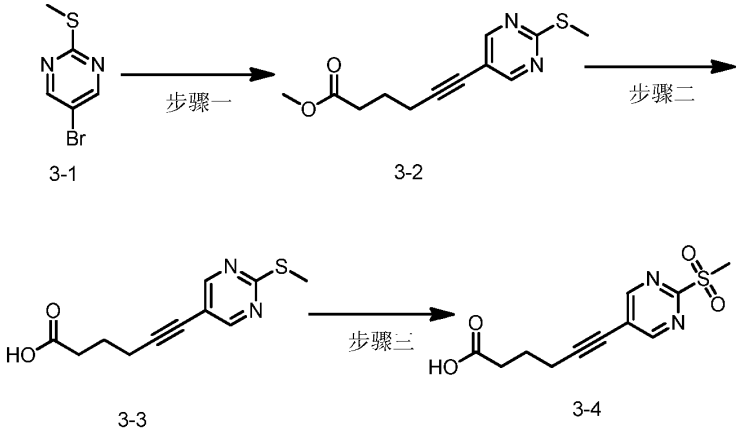
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.20 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.93-7.84 (m, 1H), 7.79 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.44 (d, *J* = 9.2 Hz, 4H), 3.98 (p, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.50 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.42-3.35 (m, 2H), 3.00 (s, 3H), 1.93-1.82 (m, 2H), 1.15 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 0.88 (t,

J = 7.3 Hz, 3H).

ESI-MS (m/z): 512.2 $[M+H]^+$.

$[\alpha]_D^{20}$为+28.19° (c =0.101g/100mL, CH_3CN).

实施例二 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-5-己炔酸（化合物 3-4）的合成



步骤一：6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-5-己炔酸甲酯（化合物 3-2）的合成

室温下，将 5-己炔酸甲酯（500 mg，3.97 mmol），5-溴-2-甲硫基嘧啶溶于 N,N-二甲基甲酰胺（3 mL）中，依次加入三乙胺（3 mL），碘化亚铜（75 mg，0.4 mmol）和二三苯基膦二氯化钯（279 mg，0.4 mmol），氮气保护下升温至 95℃搅拌反应 6 h，加水淬灭，乙酸乙酯萃取（20 mL×3），合并有机相，饱和食盐水洗涤（20 mL×2），无水硫酸钠干燥，滤除干燥剂，减压蒸除溶剂，制备液相色谱纯化，得 300 mg 标题化合物。ESI-MS (*m/z*): 251.3 $[M + H]^+$。

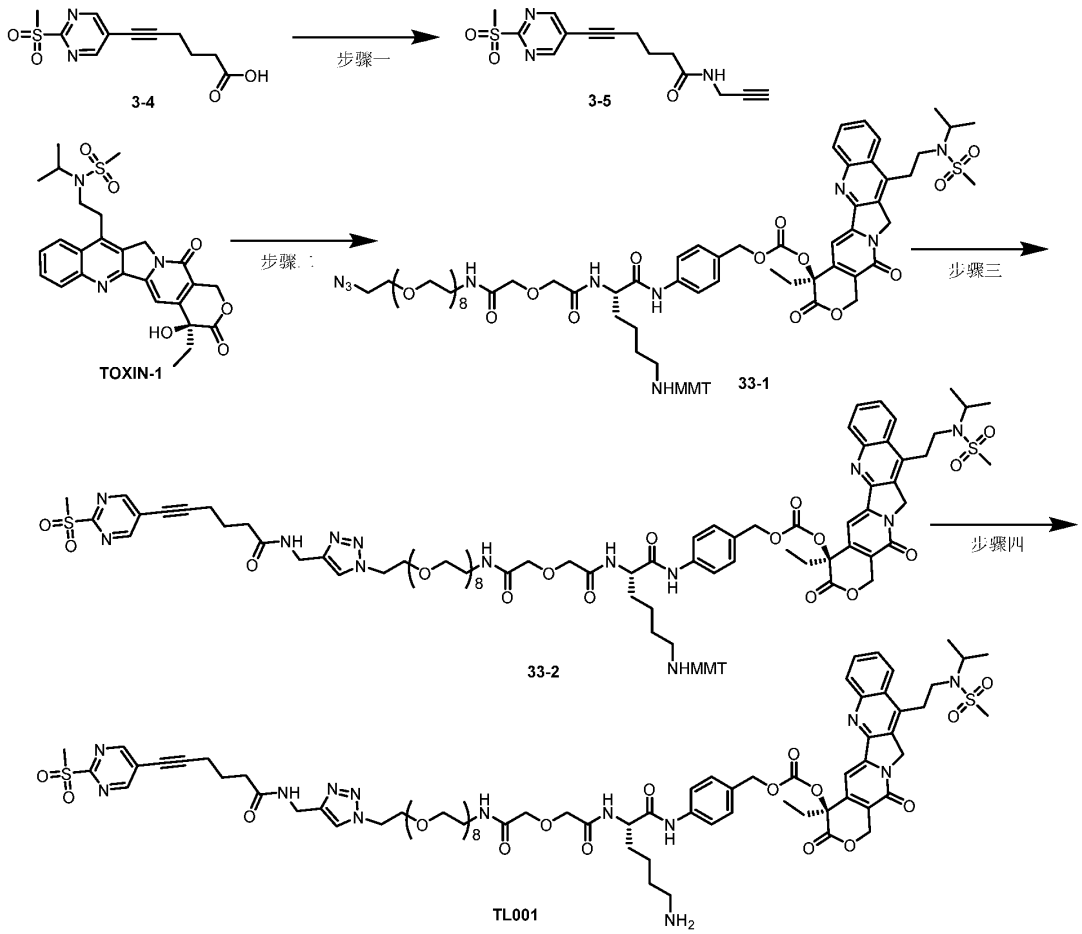
步骤二：6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-5-己炔酸（化合物 3-3）的合成

室温下，将化合物 3-2（200 mg，0.8 mmol）溶于四氢呋喃和水混合溶液中（4 mL/4 mL），加入氢氧化锂一水合物（235 mg，5.6 mmol），室温搅拌反应 4 h，加水稀释，乙酸乙酯萃取（20 mL×2），水相用 1N 盐酸调 pH=3，乙酸乙酯（20 mL×3）萃取，合并有机相，饱和食盐水洗涤（20 mL×2），无水硫酸钠干燥，滤除干燥剂，减压蒸除溶剂，得 120 mg 标题化合物。

步骤三：6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-5-己炔酸（化合物 3-4）的合成

室温下，将化合物 3-3（20 mg，0.085 mmol）溶于二氯甲烷（4 mL）中，加入间氯过氧苯甲酸（22 mg，0.127 mmol），加毕，室温搅拌反应过夜，制备液相色谱纯化，得 20 mg 标题化合物。ESI-MS (*m/z*): 269.1 $[M + H]^+$。

实施例三 （4-((S)-2-(4-氨基丁基)-35-(4-((6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五烷酰胺基）苄基)((S)-4-乙基-11-(2-(N-异丙基甲基磺酰胺基)乙基)-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)碳酸酯（化合物 TL001）的合成



步骤一：6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)-N-(炔丙基)己-5-炔酰胺（化合物 3-5）的合成

25°C 下将炔丙胺(189 mg, 3.4 mmol)和化合物 3-4 (800 mg, 2.83 mmol)溶于二氯甲烷(10 mL)中，依次加入 N,N-二异丙基乙胺(738 mg, 5.67 mmol)，O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N′,N′-四甲基脲六氟磷酸酯(1.63 g, 4.25 mmol)，搅拌反应 2 h。反应液减压浓缩，残余物经快速硅胶柱纯化（乙酸乙酯/石油醚=3/1）得 700 mg 标题化合物。ESI-MS (m/z): 306.1$[M+H]^+$。

步骤二：(4-((S)-35-叠氮基-2-(4-(((4-甲氧基苯基)二苯甲基)氨基)丁基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五烷酰氨基)苄基)((S)-4-乙基-11-(2-(N-异丙基甲磺酰胺基)乙基)-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4'：6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)碳酸酯（化合物 33-1）的合成

25°C 氮气保护下，将 TOXIN-1(250 mg, 0.49 mmol)溶于二氯甲烷(10 mL)中，降温至 0°C，加入 4-二甲氨基吡啶(478 mg, 3.91 mmol)的二氯甲烷(3 mL)溶液，然后缓慢滴加三光气(72 mg, 0.24 mmol)的二氯甲烷(10 mL)溶液，加毕，0°C 搅拌反应 20 min，反应液用氮气吹 20 min。加入(S)-2-(32-叠氮基-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6-氮杂三十二烷酰胺基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-6-(((4-甲氧基苯基)二苯甲基)氨基)己酰胺(518 mg, 0.49 mmol)的二氯甲烷（7 mL）溶液，加毕，0°C 搅拌反应 1 h。反应液减压浓缩，残余物经制备高效液相色谱纯化得 500 mg 标题化合物。ESI-MS (m/z): 1597.5$[M+H]^+$。

步骤三：((S)-4-乙基-11-(2-(N-异丙基甲磺酰胺基)乙基)-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并

[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)(4-((S)-2-(4-(((4-甲氧基苯基)二苯基甲基)氨基)丁基)-35-(4-((6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-壬氧基-3,9-二氮杂三十五烷酰胺基)苄基)碳酸酯（化合物 33-2）的合成

室温下，将化合物 33-1 (80mg，0.05 mmol) 和 3-5 片段（23mg, 0.075mmol）溶于二甲基亚砜和水 (2.0 mL：0.5 mL)中，加入溴化亚铜 (11 mg，0.08 mmol)，搅拌反应 1 h。经制备高效液相色谱纯化，得 30 mg 标题化合物。ESI-MS (m/z): 815.9[(M-273)/2+H]$^+$。

步骤四：(4-((S)-2-(4-氨基丁基)-35-(4-((6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五烷酰胺基）苄基)((S)-4-乙基-11-(2-(N-异丙基甲基磺酰胺基)乙基)-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)碳酸酯（化合物 TL001）的合成

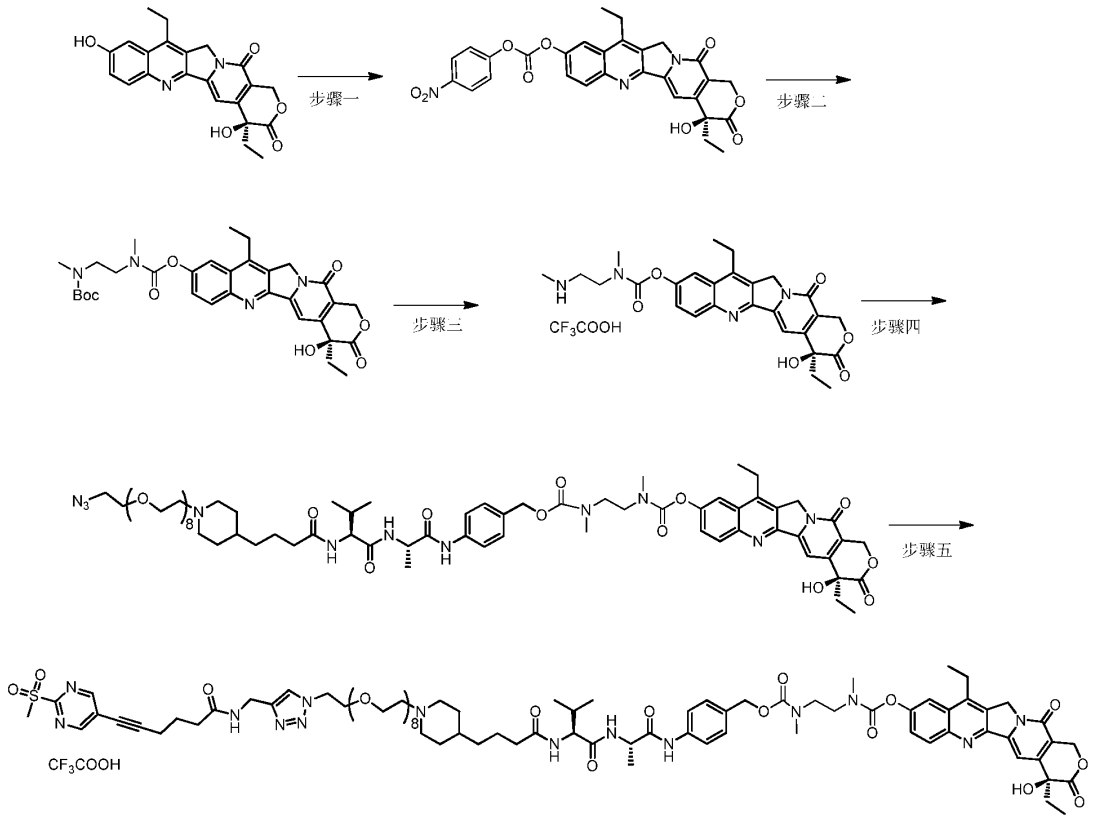
将化合物 33-2(30 mg，0.02 mmol) 溶于二氯甲烷(1.0 mL)反应液中，加入三氟乙酸(0.2 mL)，室温反应 30 min。经制备高效液相色谱纯化，得 20.0 mg 标题化合物的三氟乙酸盐。其结构表征如下：

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.18 (s, 1H), 9.10 (s, 2H), 8.38 (t, J = 5.56 Hz, 1H), 8.32 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 8.22 – 8.20 (m, 2H), 8.09 (t, J = 5.68 Hz, 1H), 7.91 – 7.87 (m, 2H), 7.82 – 7.78 (m, 1H), 7.69 (brs, 3H), 7.61 (d, J = 8.56 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.56 Hz, 2H), 7.06 (s, 1H), 5.56 (d, J = 16.96 Hz, 1H), 5.51 (d, J = 16.96 Hz, 1H), 5.47 (d, J = 19.28 Hz, 1H), 5.42 (d, J = 19.28 Hz, 1H), 5.14 (d, J = 12.20 Hz, 1H), 5.07 (d, J = 12.16 Hz, 1H), 4.48 (t, J = 5.24 Hz, 2H), 4.46 – 4.43 (m, 1H), 4.29 (d, J = 5.60 Hz, 2H), 4.08 – 3.95 (m, 5H), 3.79 (t, J = 5.28 Hz, 2H), 3.51 – 3.43 (m, 32H), 3.40 (s, 3H), 3.39 – 3.35 (m, 2H), 3.30 – 3.26 (m, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.82 – 2.74 (m, 2H), 2.56 (t, J = 7.08 Hz, 2H), 2.29 (t, J = 7.36 Hz, 2H), 2.23 – 2.13 (m, 2H), 1.82 (p, J = 7.24 Hz, 2H), 1.78 – 1.63 (m, 2H), 1.61 – 1.49 (m, 2H), 1.42 – 1.27 (m, 2H), 1.15 (d, J = 6.80 Hz, 3H) , 1.13 (d, J = 6.76 Hz, 3H) , 0.90 (t, J = 7.32 Hz, 3H).

ESI-MS (m/z): 816.0[M/2+H]$^+$.

$[\alpha]_D^{20}$为 -19.55° (c =1.000g/100mL, CH_3CN).

实施例四 ((S)-4,11-二乙基-4-羟基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-9-基)(4-((S)-2-((S)-3-甲基-2-(4-(1-(26-(4-((6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基)哌啶-4-基)丁酰胺基)丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)乙烷-1,2-二基双(甲基氨基甲酸酯)三氟乙酸盐的合成（TL002）



步骤一：(S)-(4,11-二乙基-4-羟基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-9-基)(4-硝基苯基)碳酸酯的合成

(S)-4,11-二乙基-4,9-二羟基-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H,12H)-二酮(150 mg, 0.37 mmol)溶于二氯甲烷(15 mL)中，加入二异丙基乙胺(96.81 mg, 0.74 mmol)，再加入双（4-硝基苯基）碳酸酯(127.92 mg, 0.41 mmol)的二氯甲烷(15 mL)溶液，25℃反应 3 h。反应液浓缩，得标题化合物 207 mg。直接用于下一步反应。

ESI-MS (m/z):558.1$[M+H]^+$。

步骤二：(S)-叔丁基(4,11-二乙基-4-羟基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-9-基)乙烷-1,2-二基双(甲基氨基甲酸酯)的合成

将(S)-(4,11-二乙基-4-羟基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-9-基)(4-硝基苯基)碳酸酯(207 mg, 0.33 mmol)溶于二氯甲烷(10 mL)中，加二异丙基乙胺(130.87 mg, 1.00 mmol)和 N-甲基-N-[2-(甲胺基)乙基]氨基甲酸叔丁酯(71.34 mg, 0.37 mmol)，25℃搅拌 12 h。反应液浓缩，残余物经硅胶柱层析色谱法纯化（洗脱剂：二氯甲烷/甲醇=9/1），得标题化合物 207 mg。

ESI-MS (m/z):607.3$[M+H]^+$。

步骤三：(S)-N-甲基-(4,11-二乙基-4-羟基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-9-基)(2-(甲氨基)乙基)氨基甲酸酯三氟乙酸盐的合成

(S)-叔丁基(4,11-二乙基-4-羟基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-9-基)乙烷-1,2-二基双(甲基氨基甲酸酯) (207 mg, 0.19 mmol)溶于二氯甲烷 (8 mL)，加入三氟乙酸 (2 mL)，25℃反应 2 h。反应液浓缩，得标题化合物 200 mg。直接用于下一步反应。

ESI-MS (m/z):507.2[M+H]$^+$。

步骤四：(4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-叠氮-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基)哌啶-4-基)丁酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)((S)-4,11-二乙基-4-羟基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-9-基)乙烷-1,2-二基双(甲基氨基甲酸酯)的合成

(4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-叠氮-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基)哌啶-4-基)丁酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)(4-硝基苯基)碳酸酯(150 mg, 0.12 mmol)溶于 N,N-二甲基甲酰胺(3 mL)中，加入 1-羟基苯并三唑(34.03 mg, 0.25 mmol)和二异丙基乙胺(48.82 mg, 0.37 mmol)，再加入(S)-N-甲基-(4,11-二乙基-4-羟基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-9-基)(2-(甲氨基)乙基)氨基甲酸酯三氟乙酸盐(102.11 mg, 0.12 mmol)，25℃反应 16 h。反应液用制备高效液相色谱仪纯化，制备液经冷冻干燥，得标题化合物 44 mg。

ESI-MS (m/z):1400.7[M+H]$^+$。

色谱柱：Waters XBridge Prep C18 OBD 19 mm×150 mm×5.0μm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水(0.05%甲酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	10	90	28
3.00	10	90	28
19.00	90	10	28

步骤五：((S)-4,11-二乙基-4-羟基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-9-基)(4-((S)-2-((S)-3-甲基-2-(4-(1-(26-(4-((6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基)哌啶-4-基)丁酰胺基)丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)乙烷-1,2-二基双(甲基氨基甲酸酯)三氟乙酸盐的合成

(4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-叠氮-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基)哌啶-4-基)丁酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)((S)-4,11-二乙基-4-羟基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-9-基)乙烷-1,2-二基双(甲基氨基甲酸酯)(44 mg, 0.30 mmol)和 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)-N-炔丙基)己酰胺(14.09 mg, 0.045 mmol)溶于二甲亚砜(3 mL)和水(0.75 mL)中，加入溴化亚铜(8.65 mg, 0.06 mmol),25℃反应 1 h。反应液用制备高效液相色谱仪纯化，制备液冻干后溶于二氯甲烷(2 mL)中，加三氟乙酸(0.2 mL)，25℃下搅拌 0.5 h。制备高效液相色谱仪纯化，制备液经冷冻干燥，得标题化合物 16 mg。

ESI-MS (m/z): 853.6[M/2+H]$^+$。

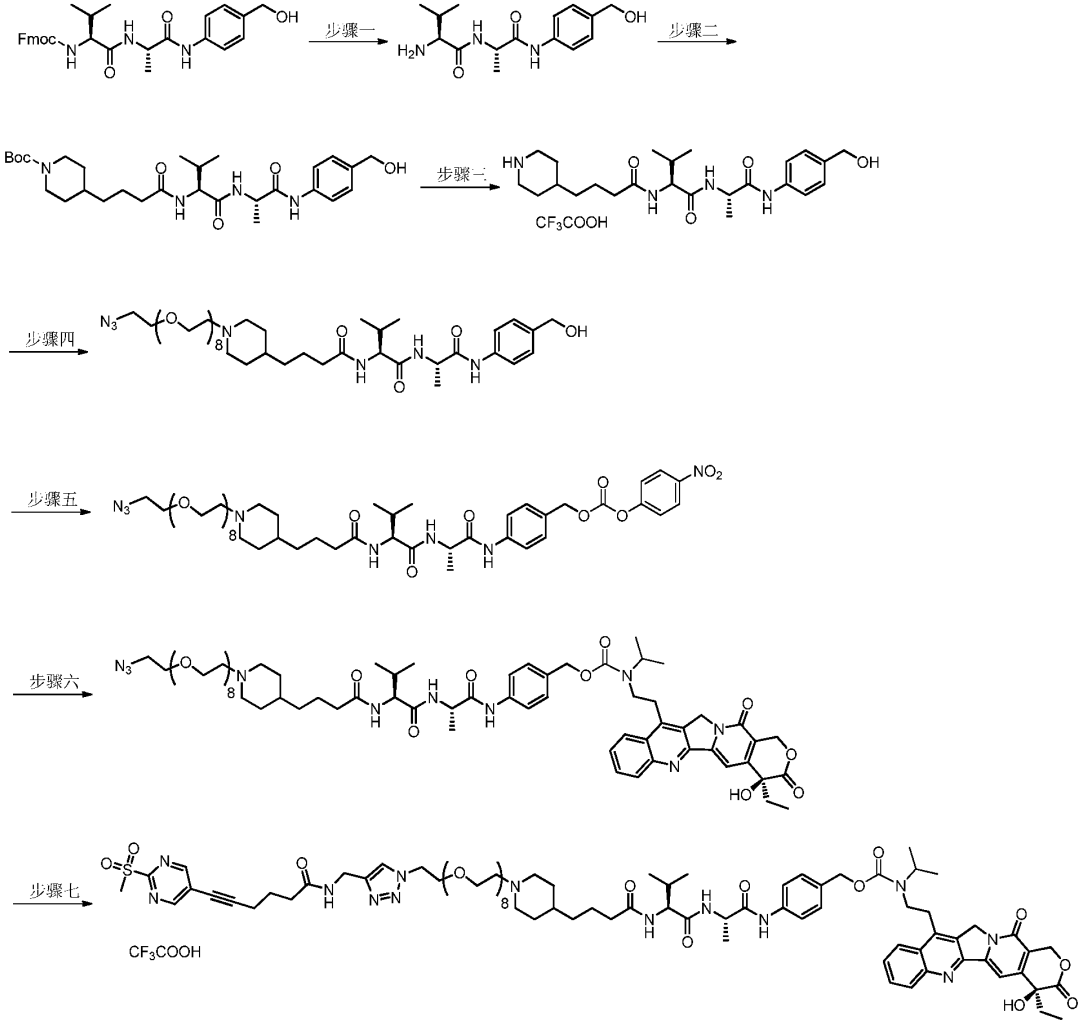
色谱柱：Waters SunFire Prep C18 ODS 5μm 19x50 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水（0.05%三氟乙酸）

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	10	90	28

4.00	10	90	28
20.00	90	10	28

实施例五 (4-((S)-2-((S)-3-甲基-2-(4-(1-(26-(4-((6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔基酰胺基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基)哌啶-4-基)丁酰胺基)丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)2-((S)-4-乙基-4-羟基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)乙基异丙基氨基甲酸酯三氟乙酸盐（TL003）



步骤一：(S)-2-氨基-N-((S)-1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙基-2-基)-3-甲基丁酰胺的合成

室温下，将((9H-芴-9-基)甲基)((S)-1-(((S)-1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙基-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁基-2-基)氨基甲酸酯（2.00 g，3.88 mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（12 mL）中，加哌啶（3 mL），25℃反应 2 h。将反应液倒入水中，析出固体，抽滤，经制备高效液相色谱仪纯化，制备液经冷冻干燥，得标题化合物 810 mg。

ESI-MS (*m/z*): 294.0$[M+H]^+$。

色谱柱：Waters SunFire Prep C18 ODS 8μm 45x450 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	7	93	60
7.00	7	93	60
50.00	50	50	60

步骤二：4-(4-((S)-1-((S)-1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙基-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁基-2-基)氨基)-4-氧代丁基)哌啶-1-甲酸叔丁酯的合成

室温下，将(S)-2-氨基-N-((S)-1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙基-2-基)-3-甲基丁酰胺（810 mg，2.76 mmol）、4-(1-(叔丁氧羰基)哌啶-4-基)丁酸和 2-乙氧基-1-乙氧基碳基-1,2-二氢喹啉溶于二氯甲烷（8 mL）和甲醇（8 mL）中，45℃反应 2 h。反应液减压浓缩，残余物经硅胶层析色谱柱(洗脱剂：二氯甲烷/甲醇=15/1)纯化，得标题化合物 1.31 g。

ESI-MS (*m/z*): 546.8[M+H]$^+$。

步骤三：(S)-N-((S)-1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙基-2-基)-3-甲基-2-(4-(哌啶-4-基)丁酰胺基)丁酰胺三氟乙酸盐的合成

室温下，将 4-(4-((S)-1-((S)-1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙基-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁基-2-基)氨基)-4-氧代丁基)哌啶-1-甲酸叔丁酯（1.3 g，2.14 mmol）溶于二氯甲烷（20 mL）中，加三氟乙酸（5 mL），25℃反应 2 h。将反应液减压浓缩，残余物溶于乙腈（30 mL）中，加碳酸钾（1.22 g，8.85 mmol），25℃反应 2 h。抽滤，滤饼用乙腈洗涤，收集滤液，减压浓缩，得标题化合物 900 mg。

ESI-MS (*m/z*): 446.9[M+H]$^+$。

步骤四：(S)-2-(4-(1-(26-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基)哌啶-4-基)丁酰胺基)-N-((S)-1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙基-2-基)-3-甲基丁酰胺的合成

室温下，将(S)-N-((S)-1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙基-2-基)-3-甲基-2-(4-(哌啶-4-基)丁酰胺基)丁酰胺三氟乙酸盐（487 mg，0.78 mmol）和 26-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基对甲苯磺酸酯（619 mg，0.94 mmol）溶于乙腈（20 mL）中，加碳酸钾（655 mg，4.69 mmol），16℃反应 6 h。反应液减压浓缩，残余物经硅胶层析色谱柱(洗脱剂：二氯甲烷/甲醇=8/1)纯化，得标题化合物 586 mg。

ESI-MS (*m/z*): 868.5[M+H]$^+$。

步骤五：(4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-叠氮-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基)哌啶-4-基)丁酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)(4-硝基苯基)碳酸酯的合成

室温下，将(S)-2-(4-(1-(26-叠氮-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基)哌啶-4-基)丁酰胺基)-N-((S)-1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙基-2-基)-3-甲基丁酰胺（585 mg，0.64 mmol）溶于二氯甲烷（30 mL）中，加 N,N-二异丙基乙胺（334.31 mg，2.56 mmol），然后滴加二(对硝基苯)碳酸酯（602.35 mg，1.92 mmol）的二氯甲烷（30 mL）溶液，25℃反应 6 h。反应液减压浓缩，残余物加入甲基叔丁基醚，抽滤，得标题化合物 760 mg。

ESI-MS (*m/z*):1033.4[M+H]$^+$。

步骤六：(4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-叠氮-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基)哌啶-4-基)丁酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)2-((S)-4-乙基-4-羟基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)乙基异丙基氨基甲酸酯的合成

室温下，将(4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-叠氮-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基)哌啶-4-基)丁酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)(4-硝基苯基)碳酸酯（150 mg，0.12 mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（3 mL）中，加 1-羟基苯并三唑（34.03 mg，0.25 mmol）和 N,N-二异丙基乙胺（48.82 mg，0.37 mmol），然后加(S)-4-乙基-4-羟基-11-(2-(异丙基氨基)乙基)-1,12-二氢-14H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮盐酸盐（59.79 mg，0.12 mmol），反应液室温搅拌过夜。反应液经制备高效液相色谱仪纯化，制备液冷冻干燥，得标题化合物 64 mg。

ESI-MS (*m/z*):1327.6[M+H]$^+$。

步骤七：(4-((S)-2-((S)-3-甲基-2-(4-(1-(26-(4-((6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔基酰胺基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基)哌啶-4-基)丁酰胺基)丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)2-((S)-4-乙基-4-羟基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)乙基异丙基氨基甲酸酯三氟乙酸盐的合成

室温下，将(4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-叠氮-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十六烷基)哌啶-4-基)丁酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)2-((S)-4-乙基-4-羟基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)乙基异丙基氨基甲酸酯（64 mg，0.046 mmol）和 6-(2-(甲基磺酰基)嘧啶-5-基)-N-(丙-2-炔-1-基)己酰胺（21.63 mg，0.069 mmol）溶于二甲亚砜（4 mL）和水（1 mL）中，加溴化亚铜（13.27 mg，0.092 mmol），25℃反应 1 h。反应液经制备高效液相色谱仪纯化，制备液经冷冻干燥，得标题化合物 35 mg。ESI-MS (*m/z*):1632.8[M+H]$^+$。

色谱柱：Waters SunFire Prep C18 OBD 5μm 19x150 mm

流动相 A：乙腈；流动相 B：水(0.05%三氟乙酸)

时间[min]	流动相 A [%]	流动相 B [%]	流速[mL/min]
0.00	10	90	28
2.00	10	90	28
18.00	90	10	28

实施例六 靶向人 Claudin 18.2 单克隆抗体的制备

本发明中靶向人Claudin 18.2单克隆抗体为人源化单克隆抗体，包括2C6.9-hz11和2C6.9-hz21，其CDR、可变区序列及恒定区序列信息如表1所示：

表1：序列信息简表

SEQ ID NO	描述	SEQ ID NO	描述
1	IMGT 2C6.9 CDR-H1	13	人源化抗体 2C6.9-hz11 重链可变区
2	IMGT 2C6.9 CDR-H2	14	人源化抗体 2C6.9-hz21 重链可变区

3	IMGT 2C6.9 CDR-H3	15	人源化抗体 2C6.9-hz11/2C6.9-hz21 轻链可变区
4	IMGT 2C6.9 CDR-L1	16	人 IgG1 重链恒定区
5	IMGT 2C6.9 CDR-L2	17	人 κ 轻链恒定区
6	IMGT 2C6.9 CDR-L3	18	2C6.9-hz11 人源化抗体重链全长氨基酸序列
7	AbM 2C6.9 CDR-H1	19	2C6.9-hz21 人源化抗体重链全长氨基酸序列
8	AbM 2C6.9 CDR-H2	20	人源化抗体 2C6.9-hz11/2C6.9-hz21 轻链全长氨基酸序列
9	AbM 2C6.9 CDR-H3	21	IMGT 2C6.9 CDR-H2（改造后）
10	AbM 2C6.9 CDR-L1	22	AbM 2C6.9 CDR-H2（改造后）
11	AbM 2C6.9 CDR-L2	23	鼠源抗体 2C6.9M 重链可变区
12	AbM 2C6.9 CDR-L3	24	鼠源抗体 2C6.9M 轻链可变区

6.1 人 Claudin 18.2 和人 Claudin 18.1 过表达细胞系的构建及鉴定

6.1.1 人 Claudin18.2 和人 Claudin18.1 过表达细胞系构建

为验证人 Claudin 18.2 抗体的特异性及功能，将人 Claudin 18.2 完整编码序列（基因编号：NM_001002026.2，由南京金斯瑞生物科技有限公司合成）和人 Claudin 18.1 完整编码序列（基因编号：NM_016369.3，由南京金斯瑞生物科技有限公司合成）克隆到慢病毒载体 pLVX-IRES-puro 上，并通过文献所述（Mohammadi Z etl., Mol Biotechnol. 2015 Sep;57(9):793-800.）慢病毒包装系统制备病毒，获得病毒后分别感染 HEK293T、L929、KATOIII 及 NCI-N87 细胞，通过嘌呤霉素筛选及单克隆挑选，获得单克隆的 HEK293T-Claudin 18.1、HEK293T-Claudin 18.2、L929-Claudin 18.2、KATOIII-Claudin 18.2、NCI-N87-Claudin 18.2 稳定细胞系。将人 Claudin 18.2、人 Claudin 18.1 质粒通过 4D-Nucleofector X 转染试剂盒（Lonza, Cat# V4XC-3012）转染 BaF/3 细胞（DSMZ, Cat# ACC300），转染 48 小时后加 1.25 mg/mL hygromycin (Thermo Fisher Sci. Cat# 10687010)进行筛选，筛选 12 天后分选得到单克隆，获得单克隆的 BaF/3-Claud18.1 和 BaF/3-Claud18.2 细胞系。

6.1.2 人 Claudin18.2 和人 Claudin18.1 过表达细胞系检测

HEK293T-Claudin 18.1 采用 Western Blot 鉴定（检测抗体：Proteintech，66167-1-Ig），其它细胞系采用流式细胞仪（流式细胞仪：Beckman，CytoFlex；检测抗体 IMAB362，序列来自于专

利：CN 101312989 B）进行鉴定。如图 1A-1D 所示，流式结果依次显示 HEK293T-Claudin 18.2、L929-Claudin 18.2、KATOIII-Claudin 18.2 、NCI-N87-Claudin 18.2 均获得阳性率高（接近 100%）、均一性较好的单克隆细胞系，可用于后续实验。Western Blot 结果（图 1E）显示三株 HEK293T-Claudin 18.1 稳定细胞系均过表达人 Claudin 18.1，其中 HEK293T-Claudin 18.1-1C2 单克隆表达量较高，可用于后续实验。

6.2 抗人 Claudin18.2 鼠源单克隆抗体的制备

本发明采用 DNA 免疫和细胞免疫的方式免疫野生型小鼠获得抗人 Claudin18.2 鼠源单克隆抗体。每只 Balb/c 小鼠通过尾静脉注射的方式注射 100 μg 含人 Claudin18.2 完整编码序列的质粒，第四次免疫和第六次免疫后，通过流式分析检测血清滴度。选取滴度较高的小鼠用 BaF/3-Claudin18.2 过表达细胞系在融合前 3-5 天进行加强免疫。采用标准的融合流程用 PEG 融合的方式将小鼠脾脏细胞和 Sp2/0 (ATCC, Cat# CRL-1581)小鼠骨髓瘤细胞系进行融合，之后采取 HAT 加压筛选，10-14 天后进行流式筛选。

通过流式细胞仪（购自 Sartorius，型号：iQue Screener Plus）筛选了 6000 个杂交瘤克隆上清，获得 43 个能够识别 HEK293T-Claudin18.2 细胞系的阳性杂交瘤克隆进行亚克隆。选择 HEK293T-Claudin18.2 和 HEK293T-Claudin18.1 细胞系进一步通过流式细胞仪筛选获得只结合人 Claudin18.2 而不结合人 Claudin18.1 的阳性克隆 14 个。最后通过有限稀释法进行亚克隆分选以获得单克隆。

人胃癌细胞系 NUGC4（购自日本 JCRB 细胞库，货号：JCRB0834）内源性表达 Claudin18.2 蛋白，被广泛用于检测抗体与内源性 Claudin18.2 的结合以及功能检测方法开发。采用 NUGC4 细胞对候选克隆进行了检测，最终选取了 7 个亚克隆作为候选克隆。经进一步亲和力检测后，选取 2C6.9M 进行可变区扩增及人源化。

为了检测候选杂交瘤克隆的抗体亚型，采用 Pierce Rapid Isotyping 试剂盒(Thermo Fisher Sci. Cat# 26179)对 2C6.9M 进行了鉴定。鉴定结果表明其重链为 IgG1 亚型，轻链为 Kappa 亚型。

杂交瘤细胞培养到 8000 个左右，细胞裂解并采用 cDNA 反转录试剂盒（Thermo Fisher Sci. Cat# 18080-200）合成第一链 cDNA。采用引物从 cDNA 中 PCR 方式扩增 VH 和 VK (VL Kappa)基因，PCR 产物通过 DNA 纯化试剂盒(Qiagen, Cat#28104)纯化，并连接到 TOPO 载体上(Thermo Fisher Sci. Cat#K457540)。每一个连接反应大概挑取 12 个克隆进行测序。序列通过 Vector NTI 11.5 (Thermo Fisher Sci.)和 Sequencer 5.4.6 (Genecodes)进行分析。获得鼠源抗体 2C6.9M 可变区序列以及 CDR 序列如表 2 所示。

表 2：2C6.9 可变区及 CDR 氨基酸序列（SEQ ID NO:）

克隆编号	VH	VL	定义方式	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
2C6.9M	23	24	IMGT	1	2	3	4	5	6
			AbM	7	8	9	10	11	12

6.3 鼠源抗体 2C6.9M 的人源化

采用 CDR 移植抗体人源化改造方法对鼠源抗体 2C6.9M 进行人源化改造。简言之，人源化改造涉

及以下步骤：把鼠源单克隆抗体的氨基酸序列与人胚系抗体氨基酸序列进行比对，找出同源性高，理化性质较优的序列，作为人胚胎系框架序列；分析考察 HLA-DR 亲和性，选出亲和力低的人胚胎系框架序列；再将鼠源抗体的六个 CDR 分别移植到选定的重链及轻链框架序列上。

具体而言，将鼠源抗体 2C6.9M 的重链和轻链 CDR 区分别移植到对应的人源化模板的 FR 框架上。2C6.9M 的重链、轻链人源化模板分别为人胚系基因序列 IGHV4-59*01（参见 IMGT 登录号 AB019438）及 IGKV4-1*01（参见 IMGT 登录号 Z00023）。

进一步利用计算机模拟技术，应用分子对接分析可变区及其周边的框架氨基酸序列，考察其空间立体结合方式。通过计算静电力，范德华力，亲疏水性和熵值，分析该鼠源抗体氨基酸序列中可与 Claudin18.2 作用以及维护空间构架的关键氨基酸，并在移植后的抗体中，保留这些鼠源的氨基酸。也即，对上述人源化模板的 FR 区氨基酸残基进行了一系列的回复突变，以使人源化抗体尽可能保留鼠源抗体的抗原结合能力。

鼠源抗体 2C6.9M 的可变区序列如 SEQ ID NO：23、SEQ ID NO：24 所示，其 CDR 序列如 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO：12 所示。为在不影响亲和力的情况下避免异构体的发生，本发明将 2C6.9 CDR-H2 氨基酸序列进行改造，改造后序列如 SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：22 所示。最终构建了 2 株人源化抗体，分别命名为 2C6.9-hz11、2C6.9-hz21。各抗体的重链恒定区均为人野生型 IgG1 重链恒定区（SEQ ID NO：16），抗体的轻链恒定区为人野生型 IgG1 κ 轻链恒定区（SEQ ID NO：17）。

2C6.9 各抗体的可变区，恒定区以及重轻链氨基酸序列如表 1 所示。

本发明将 2C6.9 的人源化抗体的重链和轻链氨基酸序列通过密码子优化合成 cDNA 连接入质粒 pcDNA3.4（委托南京金斯瑞生物科技有限公司）。重链和轻链对应的 pcDNA3.4 同时转染到 Expi293F 细胞中（购买自 Thermo 公司），将该细胞培养后的上清通过 protein A (MabSelect SuRe, GE)亲和层析柱纯化后获得 2C6.9 的人源化单克隆抗体。

6.4 2C6.9 的人源化单克隆抗体亲和力检测

采用 HEK293T-Claudin 18.2 细胞检测 2C6.9-hz21 与细胞膜上人 Claudin 18.2 亲和力。具体步骤如下：消化 HEK293T-Claudin18.2 细胞，离心重悬，PBS 洗两次；用 PBS（含 1%BSA）重悬细胞，按 300000 细胞/孔铺细胞至 96 孔尖底板中，每孔 50μl 体积，铺 20 个孔；在每个孔中分别加入 50μL 2C6.9-hz21 及 IMAB362 抗体，终浓度按 1000 nM 起始，3 倍梯度稀释，共 11 个浓度点；以 Human IgG 作为阴性对照；混匀，4℃避光反应 1 小时；PBS 洗 3 次，加入 FITC 标记的抗人 Fc 二抗（品牌：BioLegend，货号：409322），4℃避光孵育 0.5 小时；PBS 洗 3 次，流式上机（流式细胞仪品牌：Beckman，型号：Cytoflex）检测。

实验结果如图 2 及表 3 所示，通过流式细胞技术检测 2C6.9-hz21 与 HEK293T-Claudin 18.2 结合亲和力 EC50 值小于 IMAB362，最大荧光信号值大于 IMAB362，表明 2C6.9-hz21 与细胞膜上 Claudin 18.2 亲和力优于 IMAB362。

表 3：人源化抗体 2C6.9-hz21 结合 HEK293T-Claudin 18.2 流式亲和力检测

抗体名称	EC50（nM）	Max MFI
2C6.9-hz21	5.767	165866.3
IMAB362	8.217	156715.7

6.5 2C6.9 的人源化单克隆抗体亲和力及特异性测定

人 Claudin 18.2 为 4 次跨膜的膜蛋白，结构较为复杂，采用细胞 ELISA 的方法进行检测，以保证 Claudin 18.2 抗原分子的完整构型。选用 6.1 中构建的 L929-Claudin 18.2 稳定细胞系进行检测。具体实验步骤如下：将贴壁生长的 L929-Claudin 18.2 细胞系用 2 mM EDTA 消化，重悬至 2×10^5 细胞/毫升，每孔 100 μL 铺于 96 孔板中，37℃培养过夜；第二天去掉培养基，PBS 清洗一次，每孔加入 100 μL 4%甲醛室温固定 30 分钟，去甲醛，PBS 清洗两次，加入 100 μL PBS（含 2% BSA）于 37℃封闭 2 小时；去封闭液，用 PBS（含 2% BSA）稀释待测抗体，1 μM 起始，4 倍稀释，11 个浓度点，100 μL/每孔，37℃孵育 2 小时；250 μL PBST 清洗 5 次，每次静置 2 分钟；PBS（含 2 % BSA）稀释辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗人 IgG 二抗（HRP-anti-Human IgG，Jackson ImmunoResearch，109-035-003），1:10000 稀释，100 μL/孔，37℃孵育 1 小时；250 μL PBST 清洗 6 次，每次静置 2 分钟；加入 100 μL TMB 显色液（Thermo，34029）到对应的孔中，37℃显色 20 分钟；加入 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止，酶标仪（MD，SpectraMax M2）450 nm 读数，结果导入 Graphpad Prism 进行曲线拟合。

实验结果如图 3 及表 4 所示，表明人源化抗体 2C6.9-hz21 与人 Claudin18.2 亲和力显著优于 IMAB362。同样的实验测得人源化抗体 2C6.9-hz11 与抗体 2C6.9-hz21 亲和力接近（结果略）。

表 4：人源化抗体 2C6.9-hz21 结合 L929-Claudin 18.2 细胞 ELISA 亲和力检测

抗体名称	EC50（nM）	最大信号值（OD450）
2C6.9-hz21	0.12	0.92
IMAB362	0.15	0.53

本发明还通过流式细胞技术检测了候选抗体的特异性。具体步骤如下：消化 HEK293T、HEK293T-人 Claudin 18.1、HEK293T-人 Claudin18.2 细胞，离心重悬，PBS 洗两次；用 PBS（含 1%BSA）重悬细胞，每种细胞分别取 300000 个细胞加入终浓度为 1000 nM 的候选抗体，混匀，4℃避光反应 1 小时；PBS 洗 3 次，加入 FITC 标记的抗人 Fc 二抗（品牌：BioLegend，货号：409322），4℃避光孵育 0.5 小时；PBS 洗 3 次，流式细胞仪检测（流式细胞仪品牌：Beckman，型号：Cytoflex）检测。

实验结果如图 4 所示，2C6.9-hz21 能够特异性地结合人 Claudin 18.2，而不结合人 Claudin 18.1。

6.6 2C6.9 的人源化抗体的补体依赖性细胞毒性（CDC）检测

2C6.9为IgG1亚型，能够有效激活补体经典途径，发挥补体依赖的细胞毒性（complement dependent cytotoxicity，CDC）功能。为测定抗体2C6.9的CDC效应，本发明以补体含量丰富的豚鼠血清（购自郑州百基，货号：S0001）为材料进行实验。具体实验步骤如下：取HEK293T-Claudin 18.2细胞，离心后调整细胞密度，5×10^4/孔铺板过夜；第二天配制DMEM+20%豚鼠血清培养基，用此培养基稀释2C6.9-hz21及IMAB362抗体，20 μg/mL起始，2倍稀释，10个浓度点；去除原来培养HEK293T-Claudin 18.2细胞的培养基，将上一步中稀释好的抗体加入至对应孔中，100 μL/孔；设置完全杀伤的阳性对照组，即加入10 μl/孔裂解缓冲液；37℃，5% CO_2培养箱静置培养3小时后，加入CellTiter-Glo Luminescent (CTG，购自Promega，货号：G7573)染液染色，50 μl/

孔，混匀30秒，于室温放置1分钟后用酶标仪（MD，SpectraMax M2）测定荧光信号值，结果导入Graphpad Prism进行曲线拟合。

实验结果如图 5 和表 6 所示，2C6.9-hz21 的 CDC 活性优于对照抗体 IMAB362。

表 6：抗 Claudin18.2 人源化抗体 2C6.9-hz21 CDC 活性检测

抗体名称	EC50 值（ng/mL）
2C6.9-hz21	1363
IMAB362	3317

6.7 2C6.9 的人源化抗体的抗体依赖性细胞毒性（ADCC）活性测定

2C6.9 为 IgG1 亚型，具有较强的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用（ADCC，antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）活性。为测定 2C6.9-hz21 的 ADCC 活性，本发明采用 NK 细胞杀伤的方法进行检测。具体实验步骤如下：取 HEK293T-Claudin 18.2 细胞，离心后调整细胞密度，1×10^4 细胞/孔铺板过夜；第二天去除板中培养基，取 NK92MI-CD16a 细胞（华博生物）离心，用空 MEMA 培养基重悬，调整细胞密度至 1×10^6/mL，50 μl/孔加入至对应孔中；用空 MEMA 培养基稀释 2C6.9-hz21 及 IMAB362 抗体，HEK293T-Claudin18.2 细胞 40 μg/ml 起始，5 倍稀释，10 个浓度点；NUGC-4 细胞 2 mg/mL 起始，5 倍稀释，11 个浓度点；将稀释好的抗体 50 μL/孔加入对应孔中，放入 37℃、5% CO_2 细胞培养箱中静置培养 5.5 小时后，在阳性对照孔中加入 lysis buffer，再静置 0.5 小时后，加入乳酸脱氢酶（LDH）检测试剂（东仁化学，CK12），50 μl/孔，每 10 分钟酶标仪（MD，SpectraMax M2）490 nm 读数,结果导入 Graphpad Prism 进行曲线拟合。

实验结果如图 6 及表 7 所示，抗体 2C6.9-hz21 在 HEK293T-Claudin 18.2 上的 ADCC 细胞杀伤活性优于 IMAB362。

表 7：抗 Claudin18.2 人源化抗体 2C6.9-hz21 ADCC 活性测定

抗体名称	EC50 值（ng/mL）	最大杀伤率（%）
2C6.9-hz21	67.67	30
IMAB362	57.66	20

实施例七 靶向人 Claudin 18.2 ADC（2C6.9-ADC）的制备

本发明采用实施例三中制备获得的 TL001 与 2C6.9 的人源化单克隆抗体进行偶联，制备 2C6.9-TL001。制备方法如下：

（1）偶联：取 2C6.9-hz21 抗体 30 mg，添加 20 mM PB+105 mM NaCl+100 mM 依地酸二钠溶液，pH 7.7，用 2M Tris 溶液调节 pH 至 7.7，然后，用 20 mM PB+105 mM NaCl pH7.7 溶液稀释（依地酸二钠终浓度为 5mM，抗体终浓度为 15 mg/mL），混匀；然后，加入 10 mM TCEP 溶液混匀，室温放置一定时间（30 或 90 分钟）；向上述溶液体系加入溶解于二甲基亚砜中的 TL001（与抗体摩尔比：5:1 或 9:1），混匀，室温静置 2 小时，得到偶联后样品，命名为 2C6.9-TL001。

（2）缓冲液置换：用 30 KDa 50ml 超滤管（Millipore）对 2C6.9-TL001 进行缓冲液置换，置换液为 10 mM 组氨酸-盐酸组氨酸+8%蔗糖（pH6.0）缓冲液，置换倍数 15 倍；收集样品，加入 10%吐温-20 使样品中吐温-20 最终浓度 0.02%（M/V）。

（3）检测：

对置换后的 2C6.9-TL001 进行 LC-MS 分子量分析，条件如下：

色谱测定条件：

液相色谱柱：Thermo MAbPac RP 3.0*100mm；

流动相 A：0.1%FA/98%H2O/2%ACN；

流动相 B：0.1%FA/2%H2O/98%ACN；

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

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

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

质谱测定条件：

质谱型号：AB Sciex Triple TOF 5600+；

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

TL001 与 2C6.9-hz21 偶联后得到的 2C6.9-TL001 的轻链、重链理论分子量及实测分子量（重链以主要糖型 G0F 计算）见下表：

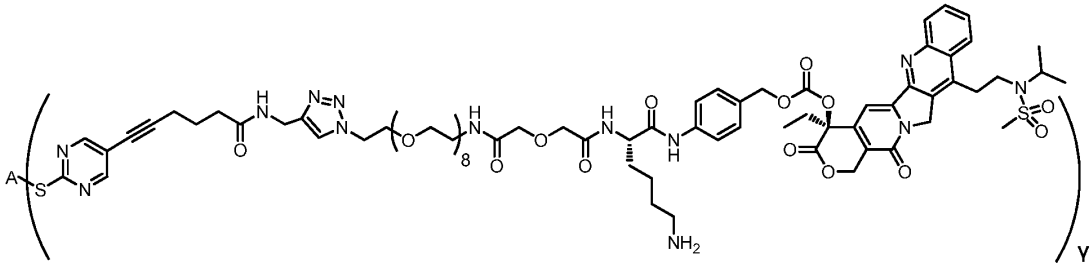
肽链		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	理论值(Da)	24090.8	25641.6	27192.3	28743.1	30293.8
	实测值(Da)	24091.6	25642.1	未检出	未检出	未检出
HC	理论值(Da)	49955.2	51505.9	53056.7	54607.4	56158.2
	实测值(Da)	49957.5	51507.9	53058.5	54609.2	56157.9

当 TL001 与 2C6.9-hz21 偶联投料比为 5:1 时，2C6.9-TL001 中抗体轻链（LC）偶联 0~1 个毒素（LC、DAR1 比例分别为 57.8%，42.2%）、重链（HC）偶联 0~4 个毒素（HC、DAR1、DAR2、DAR3、DAR4 比例分别为 22.5%、30.3%、25.0%、21.9%、0.3%），由此计算抗体与毒素的偶联比（DAR）为 3.79，计算公式：DAR=轻链 DAR1*2+重链（DAR1*1+DAR2*2+DAR3*3+DAR4*4）*2。

当 TL001 与 2C6.9-hz21 偶联投料比为 9:1 时，2C6.9-TL001 中抗体轻链偶联 0~1 个毒素（LC、DAR1 比例分别为 7.5%，92.5%）、重链偶联 0~4 个毒素（HC、DAR1、DAR2、DAR3、DAR4 比例分别为 2.5%、10.2%、9.8%、76.4%、1.1%），由此计算抗体与毒素的偶联比（DAR）为 7.12。

当 TL001 与 2C6.9-hz21，偶联投料比为 9:1 时，经偶联和阳离子层析后、2C6.9-TL001 中抗体轻链偶联 0~1 个毒素（LC、DAR1 比例分别为 1.5%， 24.0%）、重链偶联 0~4 个毒素（HC、DAR1、DAR2、DAR3、DAR4 比例分别为 0.7%、2.1%、14.3%、54.5%、2.8%），由此计算的抗体与毒素的偶联比（DAR）为 7.40。

2C6.9-TL001 中的 ADC 分子结构如下:



其中 γ 为 1~10 的整数，A 为 2C6.9-hz21。

通过 SEC-HPLC 对缀合物进行 SEC 检测。

色谱条件：

液相色谱柱：TSKgel G3000SWxl，300*7.8 mm，5 μm；

流动相：90mmol/L Na2HPO4，30mmol/L NaH2PO4，200mM NaCl，5%乙腈；

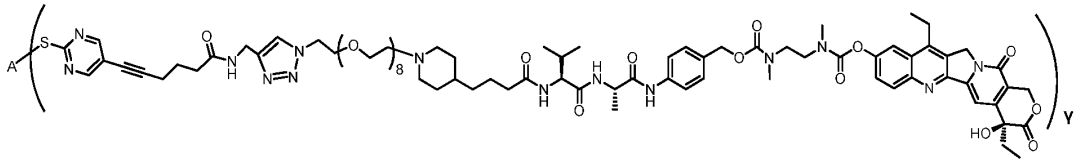
流速：0.8 ml/min；检测波长：280 nm；柱温：室温；样品室温度：8 °C；

进样量：40μl；等度运行：30min。

2C6.9-TL001（DAR：3.79）及 2C6.9-TL001（DAR：7.12）的 SEC 色谱图如图 7-8 所示，2C6.9-TL001（DAR：7.40）的 SEC 色谱图如图 13 所示，根据 SEC 保留时间及峰面积比例，确认主要偶联产物分子量约为 150kD，即 TL001 与 2C6.9-hz21 偶联得到的 2C6.9-TL001，仍然保持抗体的完整结构。

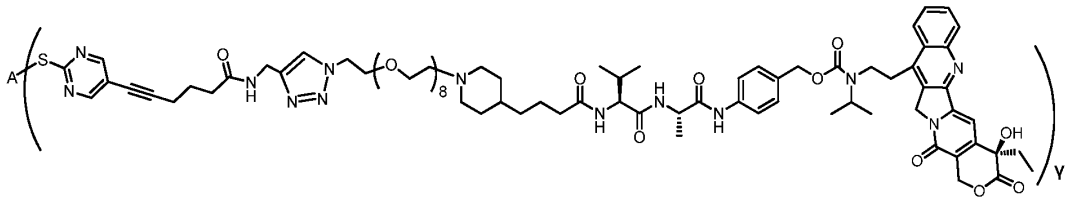
采用相同制备方法将实施例四及实施例五中制备获得的 TL002、TL003 与人源化单克隆抗体 2C6.9 进行偶联，制备 2C6.9-TL002、2C6.9-TL003，制备及检测方法如上所述，最终获得 2C6.9-TL002、2C6.9-TL003 的 DAR 值分别为 6.95、7.03。

2C6.9-TL002 中的 ADC 分子结构如下：



其中 γ 为 1~10 的整数，A 为 2C6.9-hz21。

2C6.9-TL003 中的 ADC 分子结构如下：



其中 γ 为 1~10 的整数，A 为 2C6.9 抗体。

实施例八 2C6.9-TL001 的亲和力检测

本发明采用细胞 ELISA 法检测 2C6.9-TL001（DAR：7.12）与细胞膜表面 Claudin 18.2 亲和力。具体实验步骤如下：将贴壁生长的 L929-Claudin 18.2 细胞系用 2 mM EDTA 消化，重悬至 2*10^5 细胞/毫升，每孔 100 μL 铺于 96 孔板中，37℃培养过夜；第二天去掉培养基，PBS 清洗一次，每孔加入 100 μL 4%甲醛室温固定 30 分钟，去甲醛，PBS 清洗两次，加入 100 μL PBS（含 2% BSA）封闭 2 小时；去封闭液，用 PBS（含 2% BSA）稀释待测 2C6.9-TL001，9.375 μg/mL 起始，4 倍稀释，9 个浓

度点，100 μL/孔加入孔中，37℃孵育 2 小时；250 μL PBST 清洗 5 次，每次静置 2 分钟；PBS（2 % BSA）稀释辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗人 IgG 二抗（HRP-anti-Human IgG，Jackson ImmunoResearch），1:10000 稀释，100 μL/孔，37℃孵育 1 小时；250 μL PBST 清洗 6 次，每次静置 2 分钟；加入 100 μL TMB 显色液（Thermo）到对应的孔中，37℃显色 20 分钟；加入 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止，酶标仪（MD）450 nm 读数并导入 Graphpad Prism 进行曲线拟合。实验结果如图 9 所示，2C6.9-TL001（DAR：7.12）细胞膜表面 Claudin 18.2 亲和力 EC_{50} 值为 39.94 ng/mL。偶联 TL001 后抗体 2C6.9-hz21 仍然具有优良的 Claudin18.2 亲和力。

实施例九 2C6.9-ADC 对 Claudin18.2 高表达肿瘤细胞系的杀伤活性检测

本发明选取 HEK293T-Claudin 18.2、HEK293T-Claudin 18.1 细胞检测 2C6.9-TL001 对 Claudin 18.2 高表达细胞系的杀伤活性。具体实验步骤如下：实验前一天用 DMEM+10% FBS 稀释细胞，100 μL/孔，每孔 1*10^4 细胞铺板过夜；第二天用 DMEM 基础培养基梯度稀释 ADC 分子，150 μg/mL（DAR：7.12）或 262.5 μg/mL（DAR：3.79）起始，4 倍稀释，11 个浓度点，加入对应孔中，每孔 100 μL，最终血清浓度为 5%；37℃、5% CO_2 培养箱中培养 48 小时；加入 CCK8（Rhinogen），20μl/孔，37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 0.5-2.5 小时，每半小时用酶标仪（MD）450 nm 读数并导入 Graphpad Prism 进行曲线拟合。

实验结果如图 10A、图 10B 及图 10C 所示，2C6.9-TL001 分子能够有效杀伤 HEK293T-Claudin 18.2 细胞，当 DAR 值为 7.12 时，其 EC_{50} 值为 473 ng/mL；当 DAR 值为 3.79 时，其 EC_{50} 值为 794.1 ng/mL。同时，2C6.9-TL001（DAR：7.12）分子对 HEK293T-Claudin18.1 杀伤活性 EC50 值为 3900 ng/mL；2C6.9-TL001（DAR：7.12）分子对 Claudin 18.2 细胞杀伤活性明显高于 Claudin 18.1 细胞（相差约 8 倍），表明这种杀伤作用是 Claudin 18.2 特异性的。

用上文所述相同的实验方法检测 2C6.9-TL002、2C6.9-TL003 对 HEK293T-Claudin 18.2、HEK293T-Claudin 18.1 细胞的杀伤活性。实验结果如图 10D、图 10E 所示，2C6.9-TL002、2C6.9-TL003 均能够有效杀伤 HEK293T-Claudin 18.2 细胞，其 EC_{50} 值为分别为 628.9 ng/mL、540.2 ng/mL；2C6.9-TL002、2C6.9-TL003 对 HEK293T-Claudin18.1 杀伤活性 EC50 值分别为 30590 ng/mL、8258 ng/mL。两者对 HEK293T-Claudin 18.2 细胞杀伤活性明显高于 Claudin 18.1 细胞，表明两者的杀伤作用是 Claudin 18.2 特异性的。

实施例十 2C6.9-抗体-药物缀合物对内源表达 Claudin 18.2 细胞系的杀伤活性检测

本发明选取胃癌细胞系 NUGC-4 检测 2C6.9-TL001 对内源性表达 Claudin 18.2 细胞的杀伤活性。具体实验步骤如下：实验前一天用 RPMI 1640+10% FBS 稀释细胞，100 μL/孔，每孔 1*10^4 细胞铺板过夜；第二天用 RPMI 1640 培养液梯度稀释 2C6.9-TL001 分子，1000 μg/mL（DAR 为 7.12）或 1750 μg/mL（DAR：3.79）起始，3 倍稀释，11 个浓度点，加入对应孔中，每孔 100 μL，最终血清浓度为 5%；37℃、5% CO_2 培养箱中培养 72 小时；加入 CCK8（Rhinogen），20 μl/孔，37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 0.5-2.5 小时，每半小时酶标仪（MD）450 nm 读数并导入 Graphpad Prism 进行曲线拟合。实验结果如图 11A 及 11B 所示，2C6.9-TL001 分子能够有效杀伤 NUGC-4 细胞，当 DAR 值为 7.12 时，其 EC_{50} 值为 2.383 μg/mL；当 DAR 值为 3.79 时，其 EC_{50} 值为 10.01 μg/mL。

用上文所述相似的实验方法检测 2C6.9-TL002、2C6.9-TL003 对 NUGC-4 细胞的杀伤活性，ADC 起始浓度为 500 μg/mL，4 倍稀释，11 个浓度点。实验结果如图 11C 所示，2C6.9-TL002、2C6.9-TL003 均能够有效杀伤 NUGC-4 细胞，其 EC_{50} 值为分别为 54.92 μg/mL、123.94 μg/mL。

实施例十一 2C6.9-hz21 抗体内化检测

本发明选取 NUGC-4 细胞检测 2C6.9 抗体的内化活性。具体实验步骤如下：取 NUGC-4 细胞，胰酶消化计数，用 PBS（含 1%BSA）重悬细胞，调整细胞密度至 3×10^6/mL；取 100 μL 重悬后细胞，加入终浓度为 100 μg/mL 的 2C6.9-hz21 抗体，以同型 Human IgG 作为阴性对照，冰上孵育 1 小时；孵育完成后用预冷 PBS 洗 3 次，用 NUGC-4 细胞培养基（1640+10%FBS）重悬细胞并将细胞分为两部分，一部分放置在 37℃细胞培养箱中孵育 4 小时（内吞组），另一部分继续在冰上孵育 4 小时（亲和力组）；孵育结束后，预冷 PBS 洗 3 次，用 50 uL PBS（含 1%BSA）重悬细胞，加入抗人荧光二抗（BioLegend），4℃孵育半小时；孵育结束后，预冷 PBS 洗 3 次，流式上机检测（Beckman），按公式：内吞(%)=[1-($MFI_{37℃抗体组}$- $MFI_{37℃对照组}$)/($MFI_{冰上抗体组}$ − $MFI_{冰上对照组}$)] ×100% 计算出抗体在内化率。实验结果表明 2C6.9-hz21 在 NUGC-4 细胞上 4 小时的内化比例为 37.79%。说明 2C6.9-hz21 偶联药物后的缀合物具有将药物内化进入细胞，并杀伤肿瘤细胞的潜力。

实施例十二 2C6.9-抗体-药物缀合物体内药效检测

本发明使用 Cancer cell line-derived xenograft（CDX）模型和 patient-derived xenograft（PDX）模型评价 ADC 分子的抗肿瘤作用。

12.1 NCI-N87-Claudin18.2+ Balb/c Nude 小鼠 CDX 模型用含 10%胎牛血清（FBS）的 RPMI1640 培养液，在 37℃，5% CO_2 的条件下培养 NCI-N87-Claudin18.2 细胞。收集指数生长期细胞，PBS 重悬，按照 5×10^6/只的细胞量（悬浮于 0.1 ml PBS），皮下接种于雌性 Balb/c Nude 小鼠（北京维通利华实验动物技术有限公司），建立皮下移植瘤模型，待肿瘤平均体积达到 70~100 mm^3 时，根据瘤体积随机分组，每组 7 只。分组当天记为第 0 天（Day 0），组别为 Human IgG1 同型对照抗体（阴性对照）组（简称 IgG1）、2C6.9-TL001（DAR：7.12）1 mg/kg 组和 3 mg/kg 组、2C6.9-TL002（DAR：6.95）1 mg/kg 组和 3 mg/kg 组。所有样品均为尾静脉注射，每周 2 次，共给药 6 次。

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

采用以下公式计算肿瘤生长抑制率 TGI (%)，用于评价抑瘤疗效：

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

其中 $V_{T末}$：处理组实验结束时肿瘤体积均值

$V_{T始}$：处理组给药开始时肿瘤体积均值

$V_{C末}$：阴性对照组实验结束时肿瘤体积均值

$V_{C始}$：阴性对照组给药开始时肿瘤体积均值

采用以下公式计算相对肿瘤增殖率 T/C（%），用于评价抑瘤疗效：

$T/C(\%)(瘤体积)=(T_t/T_0)/(C_t/C_0)\times100\%$

其中，T_0：初始（即 P0）时处理组的平均瘤体积

T_t：每次测量时处理组的平均瘤体积

C_0：初始（即 P0）时阴性对照组的平均瘤体积

C_t：每次测量时阴性对照组的平均瘤体积。

实验结果如表 8 及图 12A、12B 所示，2C6.9-TL001（DAR：7.12）对 NCI-N87-Claudin18.2 胃癌移植瘤模型的肿瘤生长有显著的抑制作用，且呈剂量依赖性。与阴性对照组相比，6 次给药后（第 21 天），2C6.9-TL001 1 mg/kg 组的肿瘤抑制率（TGI）已高达 96.03%，且有 4 只小鼠肿瘤部分消退；而 3 mg/kg 组 TGI 达到 133.50%，3 只小鼠肿瘤部分消退，4 只全部消退。2C6.9-TL002 3mg/kg 组 TGI 为 40.11%，1mg/kg 组无明显抑瘤作用。所有治疗组小鼠在观察期内均无明显的体重下降，动物耐受性良好。

表 8：NCI-N87-Claudin18.2+ Balb/c Nude 小鼠 CDX 模型

组别	剂量（mg/kg）	Day 21 肿瘤体积(mm3)（$\bar{x}$±SEM）	TGI（%）	T/C（%）	肿瘤消退（PR/CR）	P 值
IgG1	3	479.07±28.15	--	--	0/0	--
2C6.9-TL001	1	143.91±28.23	96.03	29.96	4/0	<0.0001
2C6.9-TL001	3	12.96±4.62	133.50	2.70	3/4	<0.0001
2C6.9-TL002	1	461.02±36.32	5.28	95.94	0/0	ns
2C6.9-TL002	3	339.28±43.91	40.11	70.62	1/0	<0.0001

注：TGI：肿瘤生长抑制率；T/C：相对肿瘤增殖率；PR：肿瘤部分消退；CR：肿瘤全部消退。P 值为与 IgG1 组比较结果；N/A：不适用； ns：*P*>0.05, 无统计学差异。

12.2 2C6.9-TL001 与 2C6.9 单抗+化疗 CDX 模型体内药效比较

按实验例 12.1 中方法建立 NCI-N87-Claudin18.2 皮下移植瘤模型并进行分组。分组当天记为第 0 天（Day 0），组别为 Human IgG1 同型对照抗体（阴性对照）组（简称 IgG1）、紫杉醇组（白蛋白结合型）、2C6.9 单抗与紫杉醇联用组及 2C6.9-TL001（DAR：7.12）组。所有样品均为尾静脉注射，每周 2 次，共给药 3 周，剂量如表 9 所示。

实验结果如表 9 及图 12C 所示，给药 11 天后，与阴性对照组相比，3 个给药组均能够显著抑制肿瘤生长，2C6.9-TL001（DAR：7.12）组最为显著。2C6.9-TL001（DAR：7.12）组的肿瘤抑制率（TGI）已高达 121.68%，且 7 只小鼠中 6 只肿瘤部分消退。

表 9：2C6.9-TL001 与 2C6.9 单抗+化疗 CDX 模型体内药效比较

组别	剂量（mg/kg）	Day 11 肿瘤体积(mm3)（$\bar{x}$±SEM）	TGI（%）	肿瘤消退（PR/CR）	P 值
IgG1	3	314.03±34.45	N/A	0/0	N/A
紫杉醇	12	226.21±28.26	42.40	0/0	ns
2C6.9+紫杉醇	10+12	175.03±14.30	67.43	0/0	<0.0001
2C6.9-TL001	3	62.76±9.98	121.68	6/0	<0.0001

注：TGI：肿瘤生长抑制率；T/C：相对肿瘤增殖率；PR：肿瘤部分消退；CR：肿瘤全部消退。*P*

值为与 IgG1 组比较结果；N/A：不适用；ns：*P*>0.05, 无统计学差异。

给药 21 天后，与阴性对照组相比，3 个给药组均能够显著抑制肿瘤生长，2C6.9-TL001（DAR：7.12）组最为显著。2C6.9-TL001（DAR：7.12）组的肿瘤抑制率（TGI）已高达 125.73%，且 7 只小鼠中 5 只肿瘤全部消退，2 只肿瘤部分消退。实验结果如表 10 及图 12D 所示。

表 10：2C6.9-TL001 与 2C6.9 单抗+化疗 CDX 模型体内药效比较

组别	剂量（mg/kg）	Day 21 肿瘤体积(mm3)（$\bar{x}$±SEM）	TGI（%）	肿瘤消退（PR/CR）	P 值
IgG1	3	456.60±36.43	N/A	0/0	N/A
紫杉醇	12	276.31±23.46	51.60	0/0	<0.0001
2C6.9+紫杉醇	10+12	207.52±21.25	71.43	0/0	<0.0001
2C6.9-TL001	3	17.75±3.97	125.73	2/5	<0.0001

注：TGI：肿瘤生长抑制率；T/C：相对肿瘤增殖率；PR：肿瘤部分消退；CR：肿瘤全部消退。*P* 值为与 IgG1 组比较结果；N/A：不适用。

12.3 不同 DAR 值 2C6.9-TL001 CDX 模型体内药效比较

用含 10%胎牛血清（FBS）的 RPMI1640 培养液，在 37℃，5% CO_2 的条件下培养 NUGC-4 细胞。收集指数生长期细胞，PBS 重悬，按照 5×10^6/只的细胞量（悬浮于 0.1 ml PBS），皮下接种于雌性 Balb/c Nude 小鼠（北京维通利华实验动物技术有限公司），建立皮下移植瘤模型，待肿瘤平均体积达到 70-100mm^3 左右时，根据瘤体积随机分组，每组 7 只。分组当天记为第 0 天（Day 0），组别为 Human IgG1 同型对照抗体（阴性对照）组（简称 IgG1）、2C6.9-TL001（DAR：3.79）5.25 mg/kg 组、2C6.9-TL001（DAR：3.79）17.5mg/kg 组、2C6.9-TL001（DAR：7.12）3 mg/kg 组、2C6.9-TL001（DAR：7.12）10mg/kg 组（不同 DAR 值 ADC 药物按照同等毒素载量进行设计剂量给药）。所有样品均为尾静脉注射，每周 2 次，共给药 3 周，剂量如表 11 所示。

实验结果如表 11 及图 12E、12F 所示，同等毒素载量的情况下，给药 21 天后，2C6.9-TL001 高 DAR 值（7.12）药效与低 DAR 值（3.79）药效基本相当。所有治疗组小鼠在观察期内均无明显的体重下降，动物耐受性良好。

表 11：不同 DAR 值 2C6.9-TL001 CDX 模型体内药效比较

组别	剂量（mg/kg）	Day 21 肿瘤体积(mm3)（$\bar{x}$±SEM）	TGI（%）	P 值
IgG1	17.5	1227.10±168.01	N/A	N/A
2C6.9-TL001（DAR：3.79）	5.25	736.12±92.59	43.76	<0.0001
2C6.9-TL001（DAR：3.79）	17.5	477.42±67.90	66.94	<0.0001
2C6.9-TL001（DAR：7.12）	3	670.96±113.92	49.60	<0.0001
2C6.9-TL001（DAR：7.12）	10	250.04±28.73	87.17	<0.0001

注：TGI：肿瘤生长抑制率；T/C：相对肿瘤增殖率；PR：肿瘤部分消退；CR：肿瘤全部消退。*P*

值为与 IgG1 组比较结果；N/A：不适用。

12.4 HuPrime®胃癌 GA0006+ Balb/c Nude 小鼠 PDX 模型

从 HuPrime®胃癌异种移植模型 GA0006（中美冠科生物技术（太仓）有限公司，高表达 Claudin18.2 的胃肿瘤来源于一名 57 岁女性患者）荷瘤小鼠收取肿瘤组织，切成直径为 3×3×3 mm 的瘤块接种于 Balb/c 裸小鼠右前肩胛处皮下。当荷瘤鼠平均肿瘤体积到达约 150-250 mm^3 时，根据肿瘤大小随机分组，每组 7 只，分组当天定义为第 0 天（Day 0）。组别为 3 组：Human IgG1 同型对照抗体（阴性对照）组（IgG1 10 mg/kg）、2C6.9-TL001-DAR7.12 3 mg/kg 组和 10 mg/kg 组。所有样品均为尾静脉注射，每周 2 次，共给药 5 次。给药后观察并定期测量小鼠肿瘤体积及体重，测量方法如实验例 12.1 所述。

实验结果如表 12 及图 12G、12H 所示，2C6.9-TL001-DAR7.12 对 GA0006 胃癌 PDX 模型的肿瘤生长有显著的抑制作用，且呈剂量依赖性。与阴性对照组相比，5 次给药后（第 17 天），3mg/kg 组的肿瘤抑制率（TGI）已高达 94.72%，且有 4 只部分消退；10 mg/kg 组 TGI 达到 124.49%，7 只肿瘤全部消退，表明 2C6.9-TL001 可高效抑制肿瘤生长。所有治疗组在观察期内均无明显的体重下降，动物耐受性良好。

表 12：HuPrime®胃癌 GA0006+Balb/c Nude 小鼠 PDX 模型

组别	剂量 (mg/kg)	Day 17 肿瘤体积(mm3) ($\bar{x}$±SEM)	TGI (%)	T/C (%)	肿瘤消退 (PR/CR)	P 值
IgG1	10	780.46±93.30	N/A	N/A	0/0	N/A
2C6.9-TL001	3	187.00±46.07	94.72	23.96	4/0	<0.0001
2C6.9-TL001	10	0.00±0.00	124.49	0.00	0/7	<0.0001

注：TGI：肿瘤生长抑制率；T/C：相对肿瘤增殖率；PR：肿瘤部分消退；CR：肿瘤全部消退。*P* 值为与 IgG1 组比较结果；N/A：不适用。

实验结果如表 13 及图 12I、12J 所示，给药后第 24 天，2C6.9-TL001-DAR7.12 对 GA0006 胃癌 PDX 模型的肿瘤生长有显著的抑制作用，且呈剂量依赖性。与阴性对照组相比，3mg/kg 组的肿瘤抑制率（TGI）已高达 103.76%，且有 6 只部分消退；10 mg/kg 组 TGI 达到 113.70%，7 只肿瘤全部消退，表明 2C6.9-TL001 可高效抑制肿瘤生长。所有治疗组在观察期内均无明显的体重下降，动物耐受性良好。

表 13：HuPrime®胃癌 GA0006+Balb/c Nude 小鼠 PDX 模型

组别	剂量 (mg/kg)	Day 24 肿瘤体积(mm3) ($\bar{x}$±SEM)	TGI (%)	T/C (%)	肿瘤消退 (PR/CR)	*P* 值
IgG1	10	1273.78±124.49	N/A	N/A	0/0	N/A
2C6.9-TL001	3	111.83±42.26	103.76	8.78	6/0	<0.0001
2C6.9-TL001	10	0.00±0.00	113.70	0.00	0/7	<0.0001

注：TGI：肿瘤生长抑制率；T/C：相对肿瘤增殖率；PR：肿瘤部分消退；CR：肿瘤全部消退。*P* 值为与 IgG1 组比较结果；N/A：不适用。

12.5 NCI-N87-Claudin18.2+ Balb/c Nude 小鼠 CDX 模型体内药效评价

按实验例 12.1 中方法建立 NCI-N87-Claudin18.2 皮下移植瘤模型，待肿瘤平均体积达到 140mm^3 左右时，根据瘤体积随机分组，每组 8 只。分组当天记为第 0 天（Day 0），组别为 Human IgG1 同型对照抗体（阴性对照）组（简称 IgG1），2C6.9-TL001（DAR：7.40） 0.3 mg/kg 组、1 mg/kg 组和 3 mg/kg 组。所有样品均为尾静脉注射，每周 2 次，共给药 6 次，剂量如表 14 所示。

实验结果如表 14 及图 12K 和 12L 所示，6 次给药后停药延长观察至第 31 天(首次给药后第 31 天)，与阴性对照组相比，2C6.9-TL001 0.3 mg/kg 组的肿瘤抑制率（TGI）为 34.04%；而 1 mg/kg 组和 3 mg/kg 组 TGI 分别高达 122.57%（全部小鼠肿瘤部分消退）和 184.22%（4 小鼠肿瘤全部消退，4 小鼠肿瘤部分消退）。所有治疗组小鼠在观察期内均无明显的体重下降，动物耐受性良好。

表 14：NCI-N87-Claudin18.2+ Balb/c Nude 小鼠 CDX 模型体内药效评价

组别	剂量	Day 31				
		肿瘤体积(mm3)	TGI	T/C	肿瘤消退	*P* 值
	（mg/kg）	（$\bar{x}$±SEM）	（%）	（%）	（PR/CR）	
IgG1	3	592.50±24.38	N/A	N/A	0/0	N/A
2C6.9-TL001	0.3	437.74±16.68	34.04	74.04	0/0	<0.001
2C6.9-TL001	1	107.06±9.63	122.57	18.13	8/0	<0.0001
2C6.9-TL001	3	21.83±2.26	184.22	3.69	4/4	<0.0001

注：TGI：肿瘤生长抑制率；T/C：相对肿瘤增殖率；PR：肿瘤部分消退；CR：肿瘤全部消退。*P* 值为与 IgG1 组比较结果；N/A：不适用。

12.6 HEK293T-Claudin18.2+ Balb/c Nude 小鼠 CDX 模型体内药效评价

用含 3μg/mL puromycin 和 10%胎牛血清（FBS）的 DMEM 培养液，在 37℃，5% CO_2 的条件下培养 HEK293T-Claudin18.2 细胞（人胚肾细胞）。收集指数生长期细胞，PBS 重悬，按照 1×10^7/只的细胞量（悬浮于 0.1 ml PBS），皮下接种于雌性 Balb/c Nude 小鼠（浙江维通利华实验动物技术有限公司），建立皮下移植瘤模型，待肿瘤平均体积达到 120-140 mm^3 左右时，根据瘤体积随机分组，每组 8 只。分组当天记为第 0 天（Day 0），组别为 Human IgG1 同型对照抗体（阴性对照）组（简称 IgG1），2C6.9-TL001（DAR：7.40） 0.3 mg/kg 组、1 mg/kg 组和 3 mg/kg 组。所有样品均为尾静脉注射，每周 2 次，共给药 6 次，剂量如表 15 所示。

实验结果如表 15 及图 12M 和 12N 所示，与阴性对照组相比，6 次给药后（首次给药后第 21 天），2C6.9-TL001（DAR：7.40）对 HEK293T-Claudin18.2 人胚肾细胞移植瘤模型的肿瘤生长有显著的抑制作用，且呈剂量依赖性。2C6.9-TL001 0.3 mg/kg 组的肿瘤抑制率（TGI）为 70.99%（1 只小鼠肿瘤全部消退）；而 1 mg/kg 组和 3 mg/kg 组 TGI 分别为 94.98%（2 只小鼠肿瘤部分消退）和 182.81%（2 只小鼠肿瘤部分消退，6 只小鼠肿瘤全部消退）。

表 15：HEK293T-Claudin18.2+ Balb/c Nude 小鼠 CDX 模型体内药效评价

组别	剂量	Day 21				
		肿瘤体积(mm3)	TGI	T/C	肿瘤消退	*P* 值
	（mg/kg）	（$\bar{x}$±SEM）	（%）	（%）	（PR/CR）	

IgG1	3	1547.48±245.85	N/A	N/A	0/0	N/A
2C6.9-TL001	0.3	507.95±99.30	70.99	32.83	0/1	<0.01
2C6.9-TL001	1	156.48±23.87	94.98	10.13	2/0	<0.0001
2C6.9-TL001	3	14.36±3.63	182.81	0.92	2/6	<0.0001

注：TGI：肿瘤生长抑制率；T/C：相对肿瘤增殖率；PR：肿瘤部分消退；CR：肿瘤全部消退。*P* 值为与 IgG1 组比较结果；N/A：不适用。

12.7 NUGC-4+ Balb/c Nude 小鼠 CDX 模型体内药效评价

用含 10%胎牛血清（FBS）的 RPMI1640 培养液，在 37℃，5% CO_2 的条件下培养 NUGC-4 细胞。收集指数生长期细胞，PBS 重悬，按照 5×10^6/只的细胞量（悬浮于 0.1 ml PBS），皮下接种于雌性 Balb/c Nude 小鼠（浙江维通利华实验动物技术有限公司），建立皮下移植瘤模型，待肿瘤平均体积达到 80 mm^3 左右时，根据瘤体积随机分组，每组 8 只。分组当天记为第 0 天（Day 0），组别为 Human IgG1 同型对照抗体（阴性对照）组（简称 IgG1），2C6.9-TL001（DAR：7.40） 3 mg/kg 组和 10 mg/kg 组。所有样品均为尾静脉注射，每周 2 次，共给药 6 次，剂量如表 16 所示。

实验结果如表 16 及图 12O 和 12P 所示，与阴性对照组相比，6 次给药后（首次给药后第 21 天），2C6.9-TL001（DAR：7.40）对 NUGC-4 胃癌移植瘤模型的肿瘤生长有显著的抑制作用，且呈剂量依赖性。2C6.9-TL001 3 mg/kg 组的肿瘤抑制率（TGI）为 56.62%；而 10 mg/kg 组 TGI 为 90.28%（2 只小鼠肿瘤部分消退）。

表 16：NUGC-4+ Balb/c Nude 小鼠 CDX 模型体内药效评价

组别	剂量	Day 21				
		肿瘤体积(mm^3)	TGI	T/C	肿瘤消退	*P* 值
	（mg/kg）	（$\bar{x}$±SEM）	（%）	（%）	（PR/CR）	
IgG1	10	782.66±47.61	N/A	N/A	0/0	N/A
2C6.9-TL001	3	385.67±35.09	56.62	48.95	0/0	<0.0001
2C6.9-TL001	10	148.23±25.52	90.28	19.09	2/0	<0.0001

注：TGI：肿瘤生长抑制率；T/C：相对肿瘤增殖率；PR：肿瘤部分消退；CR：肿瘤全部消退。*P* 值为与 IgG1 组比较结果；N/A：不适用。

综上所述，无论是 CDX 模型还是 PDX 模型，本发明中 2C6.9-TL001 均能剂量依赖性地有效抑制 Claudin18.2 阳性表达肿瘤生长，且具有良好的安全性。

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