

抗 CLDN18.2 抗体、药物偶联物及其制备方法和用途

[001] 相关申请

[002] 本申请要求 2020 年 11 月 30 日提交的发明名称为“抗 CLDN18.2 抗体、药物偶联物及其制备方法和用途”的中国专利申请 202011385844.4 号的优先权，通过援引加入的方式将该专利申请的全文整体并入本文，用于所有目的。

[003] 技术领域

[004] 本申请大体涉及生物医药领域，尤其涉及抗 CLDN18.2 抗体、相关缀合物（例如抗体-药物偶联物）及其在治疗或预防肿瘤方面的用途。

[005] 背景技术

[006] 紧密连接（tight junction, TJs）是正常上皮细胞与细胞黏附的重要功能组成部分，它们通过机械的方式连接细胞，形成上皮屏障，阻止细胞间的大分子运输，维持上皮细胞极性。构成紧密连接的蛋白主要有 Claudin（也称为闭合蛋白、密封蛋白、紧密连接蛋白等，为避免任何歧义，本说明书使用英文名称 Claudin 或简写 CLDN）、Occludin、ZO-1、ZO-2、ZO-3、cingulin、Pals1、MUPP1，其中 Claudin 蛋白和 Occludin 蛋白是最关键的蛋白。

[007] Claudin 蛋白是构成紧密连接的骨架蛋白，其异常表达可导致上皮细胞、内皮细胞结构破坏、功能受损，可能在多种疾病的发病过程中起重要作用。截止目前，已发现 Claudin 基因家族包括 24 个成员，且成员之间在进化上呈功能高度保守性。Claudin 的分子质量为 22-27kD。每个 Claudin 分子均具有相同的结构，Claudin 广泛分布于正常组织和不同肿瘤组织，且存在差异性的表达。在胃癌前病变和胃癌中也发现几种 Claudin 蛋白表达异常，并与预后有关。

[008] 人源化 Claudin18 基因具有 2 个不同的第一外显子，所以可产生两种剪切变体 Claudin18.1（以下简称 CLDN18.1）和 Claudin18.2（以下简称 CLDN18.2）。人 CLDN18.1 和 18.2 的氨基酸序列长度都是 261 个氨基酸残基，它们在 0-70 位氨基酸残基中有 21 个氨基酸残基不一样；CLDN18 的两种亚型分别在不同的组织中进行转录扩增，其中 CLDN18.1 在正常肺的细胞中选择性表达，而 CLDN18.2 在正常胃中的表达局限于已分化的胃上皮短寿细胞。

[009] 科学研究表明：虽然 CLDN18.1 与 CLDN18.2 在结构上极为相似，但它们在肿瘤中的表达大不相同，例如：在正常组织中，CLDN18.1 只在肺中表达，而 CLDN18.2 在胃中有限表达；在肿瘤组织中，CLDN18.1 在肺中并没有发生明显的高表达，而 CLDN18.2 在胃癌、食管癌、胰腺癌等癌种中表达发生上调，如当胃上皮组织发生恶性转化时，细胞极性的紊乱将导致细胞表面的 CLDN18.2 蛋白表位暴露。同时，CLDN18.2 基因也会出现异常激活，高度选择性、稳定地表达于特定肿瘤组织，参与肿瘤细胞的增殖分化和迁移，这使其成为潜在的抗肿瘤药物有效分子靶点。

[010] 胃癌在全球范围内的年发病率为 13.86/100,000，很大比例的患者在确诊时已达到中晚期，手术后的恢复令人极不满意。此外，老年人的发病率高，总生存时间平均短于一年，5 年存活率不到 20%。

[011] 胰腺癌也是当前恶性程度最高的肿瘤之一，其中位生存时间小于 6 个月，5 年整体生存率小于 6%。

[012] 基于 CLDN18.2 为靶点进行抗肿瘤药物的研发已在全球如火如荼的进行当中，目前靶向 CLDN18.2 的项目众多（约 28 个），项目类型包括靶向 CLDN18.2 的单抗、双抗及 CAR-T，所有项目中研发进度最快的是 Ganymed 公司（已被 Astellas 收购）的单克隆抗体 Claudiximab（收购后名称为 Zolbetuximab），其胃癌适应症试验已进行到三期临床阶段。进入临床阶段的项目共 9 个，大部分均处于临床前阶段，治疗效果存在很大的不确定性。基于目前的数据，尚未发现靶向 CLDN18.2 的抗体-药物缀合物（ADC）相关临床研究的报道。

[13] 虽然 CLDN18.2 是消化道癌、胰腺癌较为优秀的靶点,然而由于 CLDN18.1 与 CLDN18.2 在胞外结构域 ECD1 约 50 个氨基酸的序列上有 7 个氨基酸残基的差异,因此如何设计只特异性识别 CLDN18.2 而不识别 CLDN18.1 的抗体成为了该靶点单抗药物开发的难题。

[14] 此外,总体而言,单克隆抗体治疗虽然具有靶点特异性高、副作用低等特点,但是单独使用的疗效比较有限。因此,大多数单抗药物都与化疗药物联合使用,目前提高单抗疗效的主要途径是抗体-药物缀合物。抗体-药物缀合物(也称为抗体-药物偶联物)属于一类新型抗癌生物导弹药物,主要由三部分组成:抗体,药物分子与连接两者的接头。通过化学偶联方式将单克隆抗体与药物偶联后,抗体-药物缀合物利用单克隆抗体的靶向性,特异性地识别癌细胞表面的抗体所靶向的受体,并与受体结合,然后进入到细胞内部,利用细胞内的蛋白酶释放药物,阻止癌细胞繁殖,并杀灭癌细胞。抗体-药物偶联技术使小分子药物与生物蛋白融为一体,兼具二者之长,增强药效,并减少毒副作用,成为新一代治疗产品。

[15] 截至 2020 年 9 月,FDA 共批准了 9 款 ADC 药物上市,包括 Seattle 的 Adcetris、Genentech 的 Kadcyla 和 Polivy、Wyeth 的 Besponsa 和 Mylotarg,阿斯利康的 Lumoxiti 和 Enhertu,immunomedics 的 Trodelvy。目前尚未有中国研发的 ADC 药物上市。

[16] 无论是单独的抗体药物还是抗体-药物缀合物都是前景非常好的药物类型,在医药领域亟需更深入的研究和开发。

[17] 发明内容

[18] 第一方面,本申请提供了缀合物,所述缀合物包含偶联有一个或多个药物分子的本申请的抗 CLDN18.2 抗体或所述抗体的抗原结合片段。

[19] 第二方面,本申请提供了药物组合物,其包含第一方面所述的缀合物以及可药用载体。

[20] 第三方面,本申请提供了第一方面所述的缀合物或第二方面所述的药物组合物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

[21] 第四方面,本申请提供了治疗个体中癌症的方法,包括将治疗有效量的第一方面所述的缀合物或第二方面所述的药物组合物施用于患有所述癌症的个体。

[22] 第五方面,本申请提供了医用制品(例如药盒),其包含第一方面所述的缀合物或第二方面所述的药物组合物。

[23] 第六方面,本申请提供了第一方面所述的缀合物与抗增生剂在制备治疗肿瘤药物中的用途。

[24] 第七方面,本申请提供了药物组合物,所述药物组合物包含第一方面所述的缀合物和抗增生剂。

[25] 第八方面,本申请提供了治疗个体中肿瘤的方法,包括将治疗有效量的第一方面所述的缀合物或第二方面所述的药物组合物与抗增生剂施用于患有所述肿瘤的个体。

[26] 第九方面,本申请提供了抗 CLDN18.2 抗体或所述抗体的抗原结合片段,包含所述抗体或抗原结合片段的药物组合物,所述抗体或抗原结合片段的制药用途,以及使用所述抗体或抗原结合片段治疗肿瘤/癌症的方法。

[27] 附图说明

[28] 图 1 显示了 Claudin 蛋白结构示意图。

[29] 图 2 显示了 SYJS001 ADC 结构示意图,其中 L&D 表示接头(Linker,“L”)+药物分子(Drug,“D”)的部分,右侧的 L&D 展示了完整结构,圆圈标记部分表示 L&D 中的接头与抗体的酰胺键连接。本申请展示的 SYJS001 ADC 是位点特异性的抗体药物偶联物,每个分子由 1 个抗 CLDN18.2 全人源单克隆抗体(SYJS001 mAb)在每条重链的 Q298 位氨基酸(即 Kabat 编号 Q295)通过接头(NH₂-PEG₃-Val-Cit)偶联 1 分子的 MMAE 衍生物,抗体与接头的连接方式为稳定的酰胺键(异肽键),药物分子与抗体的平均比值(DAR)为 2.0,

相对分子量大小为 150KD。

[30]

[31] 图 3 显示了 pGenHT1.0-DGV 的质粒图谱。

[32] 图 4 显示了 SYJS001 in pGenHT1.0-DGV 质粒双酶切鉴定图, 其中泳道 M: KB Ladder; 泳道 1: 超螺旋状态; 泳道 2: 经 PvuI 酶切形成的线性化质粒; 泳道 3: 经 AscI/PmlI 酶切形成的重链、轻链片段及剩余片段。

[33] 图 5 显示了 SYJS001 in pGenHT1.0-DGV 质粒示意图。

[34] 图 6 显示了 SYJS001 ADC 修饰率鉴定图谱, 其中 4.89 和 95.11 的峰分别代表抗 CLDN18.2 单克隆抗体和抗 CLDN18.2 单克隆抗体-药物缀合物。

[35] 图 7 显示了 SYJS001 ADC DAR 分布鉴定图谱。

[36] 图 8 显示了 SYJS001 ADC 与表达人源、鼠源、猴源 CLDN18.2 细胞结合曲线。

[37] 图 9 显示了 SYJS001 抗体的交叉反应性实验结果。

[38] 图 10 显示了 SYJS001 ADC 与 CLDN18.2 蛋白的特异性结合实验结果。

[39] 图 11 显示了 SYJS001 ADC 在 HEK293-CLDN18.2 细胞中的内吞观察。

[40] 图 12 显示了 SYJS001 裸抗和 SYJS001 ADC 对 NCI-N87-CLDN18.2 的体外生长抑制作用, 其中组 1: SYJS001 ADC (方点), 组 2: SYJS001 裸抗 (圆点)。

[41] 图 13 显示了 SYJS001 裸抗和 SYJS001 ADC 对 KATOIII 的体外生长抑制作用, 其中组 1: SYJS001 ADC (方点), 组 2: SYJS001 裸抗 (圆点)。

[42] 图 14 显示了 SYJS001 裸抗和 SYJS001 ADC 对 NCI-H460-CLDN18.2 的体外生长抑制作用, 其中组 1: SYJS001 ADC (方点); 组 2: SYJS001 裸抗 (圆点)。

[43] 图 15 显示了 SYJS001 裸抗和 SYJS001 ADC 对 NUGC4-CLDN18.2 的体外生长抑制作用, 其中组 1: SYJS001 ADC (方点); 组 2: SYJS001 裸抗 (圆点)。

[44] 图 16 显示了 SYJS001 裸抗和 SYJS001 ADC 对 PATU8988S 的体外生长抑制作用, 其中组 1: SYJS001 ADC (方点); 组 2: SYJS001 裸抗 (圆点)。

[45] 图 17 显示了 SYJS001 裸抗和 SYJS001 ADC 对 BxPC-3-CLDN18.2 的体外生长抑制作用, 其中组 1: SYJS001 ADC (方点); 组 2: SYJS001 裸抗 (圆点)。

[46] 图 18 显示了 SYJS001 ADC 对 BxPC-3-CLDN18.2 的体内抑瘤作用 (相比于吉西他滨)。

[47] 图 19 显示了 SYJS001 ADC 对 NUGC4-CLDN18.2 的体内抑瘤作用 (相比于顺铂)。

[48] 图 20 显示了 SYJS001 ADC 对 BxPC-3-CLDN18.2 的体内抑瘤作用 (相比于 IMAB362-ADC)。

[49] 图 21 显示了 SYJS001 ADC 对 NUGC4-CLDN18.2 的体内抑瘤作用 (相比于 IMAB362-ADC)。

[50] 图 22 显示了 MMAE 释放与旁观者效应实验结果。

[51] 图 23 显示了 SYJS001 与 IMAB362 亲和力比较实验结果。

[52] 图 24 显示了 SYJS001 与 IMAB362 内吞率比较实验结果。

[53] 图 25 显示了 SYJS001 ADC 与 IMAB362 ADC 体外抑制细胞实验结果 (腺癌细胞模型)。

[54] 图 26 显示了 SYJS001 ADC 与 IMAB362 ADC 体外抑制细胞实验结果 (胃癌细胞模型)。

[55] 发明详细描述

[56] 定义

[57] 除非另有定义, 本文使用的所有科技术语具有本领域普通技术人员所理解的含义。关于本领域的定义及术语, 专业人员具体可参考 Current Protocols in 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。

[58] 尽管本申请的广义范围所示的数字范围和参数近似值, 但是具体实施方案中所示的数值

尽可能准确的进行记载。然而，任何数值本来就必然含有一定的误差，其是由它们各自的测量中存在的标准偏差所致。另外，本文公开的所有范围应理解为涵盖其中包含的任何和所有子范围。例如记载的“1 至 10”的范围应认为包含最小值 1 和最大值 10 之间(包含端点)的任何和所有子范围；也就是说，所有以最小值 1 或更大起始的子范围，例如 1 至 6.1，以及以最大值 10 或更小终止的子范围，例如 5.5 至 10。另外，任何称为“并入本文”的参考文献应理解为以其整体并入。

[59] 本文使用的术语“药物组合物”、“组合药物”和“药物组合”可互换地使用，其表示组合在一起以实现某种特定目的的至少一种药物以及任选地可药用载体或辅料的组合。在某些实施方案中，所述药物组合物包括在时间和/或空间上分开的组合，只要其能够共同作用以实现本申请的目的。例如，所述药物组合物中所含的成分(例如根据本申请的抗体、核酸分子、核酸分子组合和/或缀合物)可以以整体施用于对象，或者分开施用于对象。当所述药物组合物中所含的成分分开地施用于对象时，所述成分可以同时或依次施用于对象。优选地，所述可药用载体是水、缓冲水溶液、等渗盐溶液如 PBS(磷酸盐缓冲液)、葡萄糖、甘露醇、右旋葡萄糖、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、纤维素、碳酸镁、0.3% 甘油、透明质酸、乙醇或聚亚烷基二醇如聚丙二醇、甘油三酯等。所用可药用载体的类型尤其依赖于根据本申请的组合物是否配制为用于口服、鼻、皮内、皮下、肌内或静脉施用。根据本申请的组合物可包含润湿剂、乳化剂或缓冲液物质作为添加剂。

[60] 根据本申请的药物组合物、疫苗或者药物制剂可通过任何适宜的途径施用，例如可口服、鼻、皮内、皮下、肌内或静脉内施用。

[61] 本文使用的“治疗有效量”或“有效量”是指足以显示其对于所施用对象益处的剂量。施用的实际量，以及施用的速率和时间过程会取决于所治疗者的自身情况和严重程度。治疗的处方(例如对剂量的决定等)最终是全科医生及其它医生的责任并依赖其做决定，通常考虑所治疗的疾病、患者个体的情况、递送部位、施用方法以及对于医生来说已知的其它因素。

[62] 本文所使用的术语“对象”是指哺乳动物，如人类，但也可以是其它动物，如野生动物(如苍鹭、鹤、鹤等)，家畜(如鸭、鹅等)或实验动物(如猩猩、猴子、大鼠、小鼠、兔子、豚鼠、土拨鼠、地松鼠等)。

[63] 术语“抗体”广义上涵盖完整抗体和其任何抗原结合片段(“抗原结合部分”)或单链形式。“全长/完整抗体”系指包含通过二硫键而互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的蛋白。每条重链包含一重链可变区(缩写为 VH)和一重链恒定区，重链恒定区包含三个域(domain)，CH1、CH2 和 CH3。每条轻链包含一轻链可变区(缩写为 VL)和一轻链恒定区，轻链恒定区包含一个域，CL。VH 和 VL 区域还可再细分为具有高可变性的多个区，被称为互补决定区(CDR)，其间散布有更为保守的被称为框架区(FR)的多个区域。每个 VH 和 VL 均由三个 CDR 和四个 FR 构成，按照以下顺序从氨基端至羧基端排布：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的这些可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主的组织或因子结合，包括免疫系统的各种细胞(如效应细胞)和经典补体系统的第一成分(C1q)。嵌合或人源化抗体也涵盖在根据本申请的抗体中。全长/完整抗体可以是任何种类的抗体，例如 IgD、IgE、IgG、IgA 或 IgM(或上述的子类)，但抗体不需要属于任何特定的类别。根据重链的恒定域的抗体氨基酸序列，可以将免疫球蛋白指定为不同的类别。通常，免疫球蛋白有五种主要的类别：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，而且这些类别中有几个可以再被进一步区分成子类(同型)，例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2。对应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、以及 μ 。不同类别的免疫球蛋白的子单元结构和三维结构是公知的。

[64] 互补决定区(CDR，通常有 CDR1、CDR2 及 CDR3)是可变区中对抗体的亲和力和特异性影响最大的区域。VH 或 VL 的 CDR 序列有多种常见的定义方式，包括 IMGT、Chothia 定义和 Kabat 定义。对于给定抗体的可变区序列，可以根据 IMGT、Chothia 定义或者 Kabat 定义来确定 VH 和 VL 序列中的 CDR 序列。

[65] 术语“人源化抗体”是指一种抗体，其可以包含来源于人源抗体的 CDR 区、并且该抗体分子的其他部分来源于一种(或几种)人抗体。而且，为了保留结合亲和力和，可以修饰骨架(称为 FR)区段的一些残基；通过本领域技术人员已知的技术可以制备根据本申请的人源化抗体或其片段；

[66] 术语“半人源化抗体”是指相对于人源化抗体或完全人源化抗体，其一抗体链包含鼠源可变区(如在嵌合抗体中那样)并且另一抗体链包含人源化可变区的抗体。

[67] 术语“嵌合抗体”系指以下抗体，其中的可变区序列来自一物种而恒定区序列来自另一物种，例如可变区序列来自小鼠抗体而恒定区序列来自人抗体的抗体。通过使用基因重组技术可以制备根据本申请的嵌合抗体或其片段。例如，所述嵌合抗体可以通过克隆重组 DNA 来生产，所述重组 DNA 包含启动子和编码根据本申请的非人尤其是鼠单克隆抗体可变区的序列、以及编码人抗体恒定区的序列。由这种重组基因编码的本申请嵌合抗体将是，例如，鼠-人嵌合体，该抗体的特异性由来源于鼠 DNA 的可变区确定，并且其同种型由来源于人 DNA 的恒定区来确定。对于制备嵌合抗体的方法，例如，可以参考文件 Verhoeven et al.(BioEssays, 8: 74, 1988)。

[68] 术语“单克隆抗体”系指具有单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示出对于特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[69] 术语“双特异性抗体”是指同时具有两种抗原表位结合能力的抗体。两种抗原表位可以在不同抗原上，也可是在同一抗原上。双特异性抗体可以具有多种结构构型。例如，双特异性抗体可以由两个 Fc 片段以及分别与其融合的两个结合部分组成(与天然抗体相似，区别在于两个臂结合不同的抗原靶标或表位)，抗原结合部可以为单链抗体(scFv)或者 Fab 片段。

[70] 本文所使用的术语“抗原结合片段”尤其是指抗体片段如 Fv、scFv(sc 指单链)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc 片段或者双抗体(diabody)、或者通过化学修饰或通过掺入脂质体中应能够增加半寿期的任何片段，所述化学修饰例如添加聚(亚烷基)二醇如聚乙二醇(“聚乙二醇化，PEG 化”)(被称为 Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG 或 Fab'-PEG 的聚乙二醇化片段)(“PEG”为聚乙二醇)。本申请的抗 CLDN18.2 抗体的抗原结合片段具有 CLDN18.2 结合活性。例如，抗原结合片段由其来源抗体的重链或轻链可变链的部分序列构成或者包含它们，所述部分序列足以保留与其来源抗体相同的结合特异性和充分的亲和力，这种抗原结合片段将包含最少 5 个氨基酸，优选其来源的抗体序列的 10、15、25、50 和 100 个连续氨基酸。

[71] 抗原结合片段的实例包括但不限于：(1)Fab 片段，其可以是具有 VL-CL 链和 VH-CH1 链的单价片段；(2)F(ab')₂ 片段，其可以是具有两个 Fab'片段的二价片段，该两个 Fab'片段由铰链区的二硫桥(即 Fab'的二聚物)连接；(3)具有抗体的单臂的 VL 和 VH 域的 Fv 片段；(4)单链 Fv(scFv)，其可以由 VH 域和 VL 域经由肽连接子组成的单一多肽链；以及(5)(scFv)₂，其可以包含两个由肽连接子连接的 VH 域和两个 VL 域，该两个 VL 域是经由二硫桥与该两个 VH 域组合。

[72] 术语“Fc 片段”、“Fc 结构域”、“Fc 部分”或类似的术语是指抗体重链恒定区的一部分，包括铰链区(hinge)、恒定区的 CH2 片段和 CH3 片段。

[73] 通常，为了制备单克隆抗体或其抗原结合片段，尤其是鼠源的单克隆抗体或其抗原结合片段，可以参考尤其描述在手册“Antibodies”中的技术(Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp.726, 1988)或者参考 Kohler 和 Milstein 描述的从杂交瘤细胞制备的技术(Nature, 256: 495-497, 1975)。

[74] 根据本申请给定的抗 CLDN18.2 单克隆抗体的结构信息，可使用本领域已知的方法在 CHO-K1 (ATCC Number: CCL-61, Lot No.: 59965043) 中细胞中制得。

[75] 关于氨基酸或核酸序列的术语“同源性/同一性/一致性”被定义为经过序列比对和引入空位后，氨基酸或核苷酸序列变体中相同的残基的百分比，如果需要，达到最大百分比的同源性。用于比对的方法和计算机程序在本领域内是公知的。

[76] 术语“特异性结合”，是指两个分子之间的非随机结合反应，例如抗体至抗原表位的结合。

[77] 本申请的发明人首先获得了一株抗 CLDN18.2 单克隆抗体,其可在 CLDN18.2 阳性细胞上结合 CLDN18.2 并高效内化,非常适合用于 ADC 的开发。在后续 ADC 研发中,本申请的发明人发现采用 $\text{NH}_2\text{-PEG}_3\text{-Val-Cit}$ 作为接头时实现了接头和药物分子缀合的良好稳定性,从而将人源化抗体通过接头与小分子药物(例如: MMAE)偶联,获得的 ADC 药物对 CLDN18.2 高表达癌症细胞尤其是胰腺癌、胃癌和肺癌细胞具有极强的杀伤作用,并且具有很好的稳定性。具体而言,体内实验表明:在具有 CLDN18.2 阳性胃或胰腺异种移植肿瘤的裸鼠中静脉内施用抗体-药物缀合物导致剂量依赖性肿瘤生长抑制、在约 1 至 8mg/kg 的单剂量静脉内施用下观察到显著的治疗效果;最佳治疗效果在 8 mg/kg 下获得,个体显示很好的耐受性;其总体治疗效果显著,并且本申请获得的 ADC 药物能产生旁观者效应(bystander effect),进一步增强了治疗效果。

[78] 在一个方面,本申请提供了能够特异性结合 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段。具体而言,所述抗体包含重链和轻链,其中(i)所述重链包含三个 CDR 区,其中至少一个所述 CDR 区的氨基酸序列具有如 SEQ ID NO: 1、2 或 3 所示的氨基酸序列或者与其具有至少 80%(优选 85%、90%、95%、98%或者 99%)序列同一性的序列;和/或(ii)所述轻链包含三个 CDR 区,其中至少一个所述 CDR 区的氨基酸序列具有如 SEQ ID NO: 4、5 或 6 所示的氨基酸序列或者与其具有至少 80%(优选 85%、90%、95%、98%或者 99%)序列同一性的序列。

[79] 在一些特定实施方案中,所述抗体包含重链和轻链,其中(i)所述重链包含三个 CDR 区,所述 CDR 区分别具有如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示的氨基酸序列;和/或(ii)所述轻链包含三个 CDR 区,所述 CDR 区分别具有如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示的氨基酸序列。

[80] 在某些具体实施方案中,本申请的抗体或其抗原结合片段是分离的。

[81] 在某些具体实施方案中,重链包含如 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列的重链可变区,和/或轻链包含如 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[82] 在某些具体实施方案中,重链包含如 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列的重链,和/或轻链包含如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列的轻链。

[83] 在某些具体实施方案中,本申请的抗体是单克隆抗体。

[84] 在某些具体实施方案中,本申请的抗体是双异性抗体。例如,双异性抗体的一个臂可以是本申请所述的抗 CLDN18.2 抗体的抗原结合片段(例如 Fab 或 scfv),另一个臂可以是靶向其他抗原(例如,可用于 ADC 构建的其他抗原靶标)或靶向另一 CLDN18.2 抗原表位(与本申请所述的抗 CLDN18.2 抗体的 CLDN18.2 结合表位不同)的抗原结合片段(例如 Fab 或 scfv)。

[85] 在某些具体实施方案中,本申请的抗体是人源化抗体,包括半人源化抗体和全人源抗体。

[86] 在某些具体实施方案中,本申请的抗体或其抗原结合片段具有 ADCC 活性。

[87] 在某些具体实施方案中,本申请的抗体或其抗原结合片段具有 CDC 活性。

[88] 在某些具体实施方案中,本申请的抗体或其抗原结合片段特异性地结合 CLDN18.2,而基本上不结合 CLDN18.1。

[89] 在某些具体实施方案中,抗体包含选自 IgG1 亚型、IgG2 亚型或 IgG4 亚型的重链恒定区。

[90] 在某些具体实施方案中,抗体的重链恒定区可以是人 IgG1 亚型、人 IgG2 亚型、人 IgG4 亚型、鼠 IgG1 亚型或鼠 IgG2a 亚型。

[91] 在某些具体实施方案中,重链恒定区为 IgG1 亚型,即,抗体为 IgG1 型抗体。

[92] 在某些具体实施方案中,抗体包含选自 κ 亚型或者 λ 亚型的轻链恒定区。

[93] 在某些具体实施方案中,抗体的轻链恒定区可以是人 κ 亚型、人 λ 亚型、鼠 κ 亚型或者鼠 λ 亚型。

[94] 在某些具体实施方案中,本申请的抗体是 IgG1 κ 抗体。

- [95] 在某些具体实施方案中,本申请的抗体或其抗原结合片段可用于治疗或预防癌症,其中所述癌症过表达 CLDN18.2。
- [96] 在一个实施方案中,具有与 CLDN18.2 结合能力的抗体与存在于活细胞表面上的 CLDN18.2 的天然表位结合。在一个实施方案中,具有与 CLDN18.2 结合能力的抗体与 CLDN18.2 的细胞外结构域结合。在一个实施方案中,具有与 CLDN18.2 结合能力的抗体与 CLDN18.2 的第一胞外区结合。
- [97] 在另一个方面,本申请提供了编码本申请抗体的分离的多核苷酸。
- [98] 在又一个方面,本申请提供了分离的多核苷酸的组合,所述组合包括编码本申请抗体或其抗原结合片段的轻链的多核苷酸和编码本申请抗体或其抗原结合片段的轻链的多核苷酸。
- [99] 在另一个方面,本申请提供了表达载体,其包含本申请所述的多核苷酸或者本申请所述的多核苷酸的组合,所述多核苷酸与允许其所编码的多肽在宿主细胞或无细胞表达系统中表达的调节序列有效连接。
- [100] 在本申请的一些实施方案中,所述宿主细胞可以为原核宿主细胞、真核宿主细胞或噬菌体。所述原核宿主细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、链霉菌或奇异变形菌等。所述真核宿主细胞,可以为如巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌,如草地粘虫等昆虫细胞,如烟草等植物细胞,如 BHK 细胞、CHO 细胞、COS 细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。在一些实施方案中,本申请所述宿主细胞优选为哺乳动物细胞,更优选为 BHK 细胞、CHO 细胞、NSO 细胞或 COS 细胞。
- [101] 在另一个方面,本申请提供了一种抗体-药物缀合物,其包含与一个或多个药物分子偶联的本申请的抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合片段。关于本申请的抗 CLDN18.2 抗体或其抗原结合片段的实施方案和技术特征的描述参见上文。
- [102] 鉴于 CLDN18.2 主要是癌症/肿瘤细胞的分子靶点,因此在一些实施方案中,药物分子为抗癌药物。但是,本领域技术人员应当理解,当 CLDN18.2 作为非癌症/肿瘤细胞的其他疾病靶点时,药物分子可以根据目标疾病进行选择。
- [103] 抗癌药物的类型包括但不限于细胞毒性药物、免疫增强剂或放射性同位素。
- [104] 在一些实施方案中,细胞毒性药物的类型包括微管蛋白抑制剂(例如生物碱)、DNA 拓扑异构酶抑制剂、DNA 损伤剂、抗代谢药或抗肿瘤抗生素。
- [105] 在一些实施方案中,微管蛋白抑制剂包括但不限于,奥瑞斯他汀衍生物(例如 MMAE(Monomethyl auristatin E)、MMAF(Monomethyl auristatin F))或美登素生物碱衍生物(例如 DM1、DM4、安丝菌素(Ansamitocin)、美登素(Mertansine)或海兔毒素肽(dolastatin)及其衍生物)。
- [106] 在一些实施方案中,DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱类似物或 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂及其衍生物,例如,DXD、SN38、伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、22-羟基早莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氟基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氟基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吡啶并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]吡啶-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺。
- [107] 在一些实施方案中,DNA 损伤剂包括但不限于,卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD(pyrrolbenzodiazepine,吡咯并苯并二氮杂)。
- [108] 在一些实施方案中,免疫增强剂包括但不限于,左旋咪唑(levamisole)、匹多莫德(pidotimod)、咪喹莫特(imiquimod)、异丙肌苷、聚肌胞苷酸或聚肌尿苷酸。
- [109] 在一些实施方案中,抗代谢药包括但不限于,甲氨蝶呤、6-巯嘌呤或 5-氟尿嘧啶。

- [110] 在一些实施方案中，抗肿瘤抗生素包括但不限于，多肽类抗生素（例如放线菌素 D 或博来霉素）或蒽醌类药物（例如阿霉素或盐酸米托蒽醌）。
- [111] 在一些实施方案中，放射性同位素包括但不限于， ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{60}Co 或 ^{177}Lu 。
- [112] 在一些实施方案中，具有与 CLDN18.2 结合能力的抗体通过接头与药物部分共价连接。在一些实施方案中，接头是可切割接头。在一些实施方案中，接头在细胞内条件下可被切割。在一个实施方案中，接头在小于 5.5 的 pH 下可水解。在一些实施方案中，接头可被细胞内蛋白酶切割。在一些实施方案中，接头是组织蛋白酶可切割接头。在一些实施方案中，接头包含二肽。在一些实施方案中，二肽是缬氨酸（Val）-瓜氨酸（Cit）。在一些实施方案中，抗体通过抗体的半胱氨酸巯基与接头连接。在一个实施方案中，抗体通过抗体的氨基（特别是谷氨酰胺残基的氨基）与接头连接。
- [113] 接头的非限制性实例包括 mc-Val-Cit-pAB、mc-Val-Cit-pABC、mc-Val-Cit、 $\text{NH}_2\text{-(PEG)}_m\text{-Val-Cit}$ 、 $\text{NH}_2\text{-(PEG)}_m\text{-Val-Cit-pAB}$ ，其中 m 为 1 至 8 的整数。
- [114] 在某些具体实施方案中，本申请所述抗体-药物缀合物具有以下通式 Ab-(L-U)_n ，其中 Ab 表示本申请的靶向 CLDN18.2 的抗体，L 为接头（例如： $\text{NH}_2\text{-(PEG)}_m\text{-Val-Cit}$ 、 $\text{NH}_2\text{-(PEG)}_m\text{-Val-Cit-pAB}$ 、 $\text{NH}_2\text{-(PEG)}_m\text{-Val-Cit-pABC}$ 、mc-Val-Cit-pAB 或 Val-Cit，其中 m 表示 PEG 的个数，可以为 1 到 8 的整数），U 为药物（例如：DM1、DM4、MMAE、MMAF、DXD 和 SN38），n 表示药物抗体比率（Drug Antibody Ratio, DAR），DAR 值可以是平均值，可以是 1-8 的任何数值（不限于整数，也可以是小数），优选为 1 到 8 的整数，优选为 2、4、6、8，更优选为 2。
- [115] 在另一个方面，本申请提供了药物制剂（例如药物组合物），其包含本申请的抗体-药物缀合物，以及可药用稀释剂、载体或赋形剂。
- [116] 在另一个方面，本申请提供了医用制品（medical preparation），其包含本申请的抗体-药物缀合物。在一些实施方案中，医用制品以药盒的形式存在，所述药盒包含容纳本申请的抗体-药物缀合物的容器。在一个实施方案中，医用制品还包含用于在治疗或预防癌症（特别是表达 CLDN18.2 的癌症）的方法中使用所述制品的打印说明书。
- [117] 本申请提供的抗体-药物缀合物能有效地治疗和/或预防与表达 CLDN18.2（CLDN18.2 阳性）细胞相关的癌症。作为非限制性实例，癌症可以为胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌（例如非小细胞肺癌（NSCLC））、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌或胆囊癌，及上述癌症的转移灶，特别是胃癌转移、腹膜转移和淋巴结转移。适合于用本申请提供的抗体-药物缀合物治疗的癌症可以是胃、食管、胰管、胆管、肺和卵巢的腺癌，本申请提供的抗体-药物缀合物尤其适合于胃癌、胰腺癌的治疗。
- [118] 因此，本申请还提供了与上述治疗用途相关的多项发明。
- [119] 在一个方面，本申请提供了上文描述的抗体-缀合物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。
- [120] 在另一方面，本申请提供了治疗个体中癌症的方法，包括将治疗有效量的上文描述的抗体-缀合物或包含所述缀合物的药物制剂或药物组合物施用于患有所述癌症的个体。
- [121] 在另一方面，本申请提供了上文描述的抗体-缀合物与抗增生剂在制备治疗肿瘤（例如上文描述的癌症）药物中的用途。
- [122] 在另一方面，本申请提供了药物组合物，所述药物组合物包含上文描述的抗体-缀合物和抗增生剂。
- [123] 在另一方面，本申请提供了治疗个体中肿瘤的方法，包括将治疗有效量的上文描述的抗体-缀合物或包含所述抗体-缀合物的药物制剂或药物组合物与抗增生剂施用于患有所述肿瘤的个体。
- [124] 在具体实施方案中，抗增生剂包括但不限于，紫杉醇、多柔比星、多西他赛、顺铂、卡

铂、异丙铂。在某些具体实施方案中，抗增生剂也可以是其他抗体、抗体-药物偶联物或融合蛋白。

[125] 实施例

[126] 以下实施例仅用于说明而非限制本申请范围的目的。

[127] 实验设备与材料

[128]

仪器设备	生产厂家	型号
流式细胞仪	Thermo Fisher	Attune® NxT
二氧化碳培养箱	Thermo Fisher	3111 型
生物安全柜	Thermo Fisher	1300 Series A2 6 英寸
台式高速冷冻离心机	Thermo Fisher	SORVALL Stratos
倒置显微镜	奥林巴斯	CKX31 倒置显微镜
二氧化碳培养箱	Thermo Fisher	3111 型
生物安全柜	Thermo Fisher	1300 Series A2 6 英寸
台式高速冷冻离心机	Thermo Fisher	SORVALL Stratos
倒置显微镜	奥林巴斯	CKX31 倒置显微镜
激光共聚焦显微镜	奥林巴斯	FV3000
酶标仪	Tecan	M200
96 孔透明平底细胞培养板	Corning	3599
96 孔黑色平底细胞培养板	Corning	3603
样品稀释槽	BIOFIL	LTT012100,100ml
Zenon™ pHrodo™ iFL IgG Labeling Reagents	Invitrogen	Z25611
移液器	Eppendorf	Research Plus
96 孔 V 型培养板	Corning	3897
50 mL 离心管	Corning	430828
15 mL 离心管	Corning	430790
T75 细胞培养瓶	Corning	430641
T25 细胞培养瓶	Corning	430639
DPBS	BBI	E607009-0500
1×聚焦液	life technologies	A24904
1×停止液	life technologies	A24975
洗涤液	life technologies	A24974
胎牛血清	Gibco	10099-141C
DMEM 培养基	Hyclone	SH30243.01

RPMI 培养基	HyClone	SH30809.01
刃天青钠盐	Sigma	199303-25G
Anti-Anti (100x)	Gibco	15240-062
DMEM/F-12 培养基	Gibco	C11330500BT
0.25% 胰蛋白酶-EDTA	Gibco	25200-072
嘌呤霉素	Thermo	A1113802
G418	Sigma	a1720-5g
羊抗人 IgG (H+L)交叉吸附二抗, Alexa Fluor 488	Invitrogen	A11013

[129] 实验所用细胞系**[130]**

名称	生产厂家	培养条件
HEK293-huCLDN18.2	实验室自制	DMEM 完全培养基+200 µg/mL G418
HEK293-Mouse CLDN18.2	康源博创	DMEM 完全培养基+0.5 µg/ml 嘌呤霉素
Cynomolgus CLDN18.2 CHO-K1	吉满生物	DMEM/F-12 完全培养基 ATCC Number: CCL-61, Lot No.: 59965043
HEK293-CLDN18.1	实验室自制	DMEM 完全培养基 +200 µg/mL G418
HEK293	南京科佰	DMEM 完全培养基
KATOIII	南京科佰	RPMI 完全培养基
NCI-N87- CLDN18.2	康源博创	RPMI 完全培养基+0.5 µg/ml 嘌呤霉素
NCI-H460-CLDN18.2	实验室自制	RPMI 完全培养基+1 µg/ml 嘌呤霉素
NUG4-CLDN18.2	实验室自制	RPMI 完全培养基+500 µg/ml G418
PATU8988S	南京科佰	DMEM 完全培养基
BxPC-3-CLDN18.2	康源博创	DMEM 完全培养基+1 µg/ml 嘌呤霉素

[131] 实施例 1: 全人源抗 CLDN18.2 单克隆抗体的制备

[132] 本申请中所用抗 CLDN18.2 抗体为通过免疫人类 Ig 转基因小鼠产生的。转基因小鼠用转染了人类 CLDN18.2 的 CHO 细胞或者 3T3 细胞进行免疫。免疫原注射到腹膜内 (IP)、皮下 (SC)、脚垫 (fp) 或小鼠尾部。免疫应答反应通过定期检测小鼠血浆抗 CLDN18.2 的效价来测试。血浆具有足够抗 CLDN18.2 效价的小鼠用于杂交瘤融合。在最终取小鼠脾脏和淋巴结之前, 还会通过免疫原注射到腹膜内、脚垫或小鼠尾部静脉来进行免疫增强。

[133] 通过荧光流式细胞分选 (FACS) 筛选免疫小鼠的血清, 选择生产结合 CLDN18.2 的抗体的小鼠。先用梯度稀释的免疫小鼠血清来孵育表达 CLDN18.2 (CHO 或 3T3) 的细胞系, 然后用 PE 荧光标记的抗小鼠 IgG Ab 检测特异性抗体结合, 在荧光流式细胞分选仪 (iQue plus, Sartorius) 上检测。此外, 小鼠血清也通过成像测试来确认。表达 CLDN18.2 的 CHO (或 3T3 细胞) 通过免疫小鼠的血清稀释孵育, 细胞被洗净, 用甲醛固定, 洗净, 然后用 Alexa488 荧光标记的山羊抗小鼠抗体检测特异性抗体结合, 在细胞成像仪 (Cytation 5, Biotek) 上扫描和分析。确认产生结合 CLDN18.2 的抗体的小鼠后, 从免疫小鼠中取脾脏和淋巴结, 分离淋巴细胞, 通过电融合, 融合到小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 (ATCC, CRL 1581), 由此产生的杂交

瘤被用来筛选为抗 CLDN18.2 特异性抗体。细胞被铺在平底 96 孔组织培养板中,随后在选择介质 (HAT 培养液) 中孵育 2 周,然后切换到杂交瘤培养液培养。在细胞铺板后大约 10-14 天,通过前述细胞成像方法对来自单个孔的杂交瘤上清液进行抗 CLDN18.2 特异性结合成像筛查。相关杂交瘤是从一组三只小鼠的免疫组群产生的杂交瘤筛选而来。免疫小鼠后电融合产生的杂交瘤细胞被铺在平底 96 孔组织培养板中,每一孔含一个或数个杂交瘤细胞。来自单个孔的杂交瘤上清液通过细胞成像方法检测,分泌阳性抗体的克隆上清液特异性结合转染 CLDN18.2 的 CHO 细胞,但不结合转染 CLDN18.1 的 CHO 细胞和 CHO 细胞。分泌阳性抗体的杂交瘤被转移到 24 孔板,再次筛选确认。确认后的阳性抗体杂交瘤通过使用单细胞分选仪进行分选单克隆。每个阳性杂交瘤分选 96 个亚克隆,再次筛选确认。产生初步候选分子的阳性亚克隆由体外扩增培养用于测序,阳性亚克隆产生的少量抗体,用于纯化,和抗体表征验证。所获得的抗体 SYJS001,相关序列如下:

[134] 表 1

抗体区域/分类法	IMGT CDR 定义:
FR-H1	EVQLSESGGALVQPGESLRLSCAAS (SEQ ID NO:11)
CDR-H1	GFTFSSYA (SEQ ID NO:1)
FR-H2	MTWVRQAPGKGLEWVSS (SEQ ID NO:12)
CDR-H2	LSGSGRST (SEQ ID NO:2)
FR-H3	YYAASIKGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAEDTAIYYC (SEQ ID NO:13)
CDR-H3	AKSLSYYHYFDY (SEQ ID NO:3)
FR-H4	WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:14)
FR-L1	DIQLTQSPSFLSASVGD RPITCRAS (SEQ ID NO:15)
CDR-L1	QDISNY (SEQ ID NO:4)
FR-L2	LAWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:16)
CDR-L2	SAS (SEQ ID NO:5)
FR-L3	TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFASYHC (SEQ ID NO:17)
CDR-L3	QQVKTYPLT (SEQ ID NO:6)
FR-L4	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:18)

[135] SEQ ID NO:7 (重链可变区)

EVQLSESGGALVQPGESLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSSLSGSGRST
YYAASIKGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAEDTAIYYCAKSLSYYHYFDYWGQGTLLV
TVSS

[136] SEQ ID NO:8 (轻链可变区)

DIQLTQSPSFLSASVGD RPITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYSASTLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFASYHCQQVKTYPLTFGGGTKVEIK

[137] SEQ ID NO:9 (重链)

EVQLSESGGALVQPGESLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSSLSGSGRST
YYAASIKGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAEDTAIYYCAKSLSYYHYFDYWGQGTLLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVSVLT V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P
Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F
L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

[138] SEQ ID NO:10(轻链)

DIQLTQSPSFLSASVGDRVPIITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYSASTLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDEASYHCQQVKTYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[139] 实施例 2: 载体构建及抗体表达

[140] 2.1 载体的设计

[141] SYJS001 单抗表达使用的质粒载体 pGenHT1.0-DGV 由南京金斯瑞生物科技有限公司 (简称“金斯瑞”) 提供。载体图谱见图 3, 各关键元件信息见表 2:

[142] 表 2: pGenHT1.0-DGV 载体关键元件信息

元件	名称	功能
CMV 启动子	巨细胞病毒启动子	驱动外源基因转录
NeoR/KanR	新霉素抗性和卡那霉素抗性基因	筛选宿主细胞和大肠杆菌阳性克隆
GS 基因	谷氨酰氨合成酶基因	表达谷氨酰氨合成酶

[143] 本研究中, SYJS001 的重链、轻链 DNA 序列和表达载体 pGenHT1.0-DGV 均由金斯瑞人工合成。

[144] 重链的设计与合成:

[145] 人工合成的重链命名为 SYJS001-HC。5'端引入 NruI 内切酶位点, 3'端引入 PmlI 内切酶位点, 同时在 5'端 NruI 内切酶位点后面引入了 Kozak 序列, 以及信号肽序列 (19 位氨基酸): MGWSCIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO:19)。重链的表达框设计为:

[146] NruI-Kozak 序列-信号肽-SYJS001-HC-终止密码子-PmlI

[147] 轻链的设计与合成:

[148] 人工合成的轻链命名为 SYJS001-LC。合成过程中, 在轻链 5'端引入 AscI 内切酶位点, 3'端引入 FseI 内切酶位点, 同时在 5'端 AscI 内切酶位点后面引入 Kozak 序列, 以及信号肽序列 (19 位氨基酸): MGWSCIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO:19)。轻链的表达框设计为:

[149] AscI-Kozak 序列-信号肽-SYJS001-LC-终止密码子-FseI

[150] 2.2 重组载体的构建

[151] SYJS001-HC 待插入位点为 pGenHT1.0-DGV 载体下游多克隆 NruI/PmlI 位点, SYJS001-LC 待插入位点为上游多克隆 AscI/FseI 位点。2 个多克隆位点的启动子均为 CMV, 重链和轻链构建在同一空载体上。对 PCR 扩增产物 SYJS001-HC 和质粒载体 pGenHT1.0-DGV 进行 NruI/PmlI 双酶切和连接转化, 通过 Kan^r抗性标记筛选阳性克隆, 获得构建正确的重组重链表达载体, 命名为: SYJS001-HC in pGenHT1.0-DGV。接下来, 采用 AscI/FseI 对轻链 SYJS001-LC 和 SYJS001-HC in pGenHT1.0-DGV 进行双酶切、连接转化和克隆筛选, 并对阳性克隆进行 AscI/PmlI 进行双酶切鉴定 (见图 4) 和测序, 获得构建正确的重组重、轻链表达载体, 命名为: SYJS001 in pGenHT1.0-DGV, 其结构示意图见图 5。SYJS001 in pGenHT1.0-DGV 双酶切鉴定, 目的区域序列大小为 4527bp。将获得的重组质粒电转宿主细胞 CHO K1, 获得高表达 SYJS001 抗体蛋白的稳定细胞株。

[152] 2.3 抗体的表达与纯化

[153] 将高表达 SYJS001 抗体的稳定细胞株置于无血清的 CD FortiCHO 中摇瓶培养, 一定时间后收集培养上清, 用 pH=7.4 的 PBS 溶液平衡 HiTrapMabSelectSuRe 1ml 柱(GE Healthcare Life Sciences 产品, 货号: 11-0034-93)10 个柱体积, 流速为 0.5ml/min; 培养上清液用 0.45μm 滤膜过滤上样, 流速为 0.5ml/min。用 pH7.4 的 PBS 溶液 再洗 5-10 个柱体积, 流速为 0.5ml/min; 用 100mM 柠檬酸缓冲液(pH3.6)洗脱, 流速为 0.5ml/min, 收集洗脱峰, 获得纯度 > 95% 的 SYJS001 抗体。

[154] 实施例 3: SYJS001 ADC 制备

[155] 分别将一定体积的 L&D(其结构如图 2 所示)、反应缓冲液、SYJS001 抗体、mTGase(转谷氨酰胺酶)、H₂O 按照适当顺序用蠕动泵转入有弹性的乙烯-醋酸乙烯酯一次性反应袋中,反应袋密封混匀后置于 30°C,反应时间 24-144 h。反应过程每 24h 取样用 C4-HPLC 分析检测偶联率,当偶联率 $\geq 95\%$ 时,结束反应,立即纯化。

实际使用的转谷氨酰胺酶氨基酸序列如下:

**DSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQR
EWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVA
KDSFDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSP
FYSALRNTPSFKDRNGGNHDP SKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFRPD
RGTGLVDMRDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPN
GSLGAMHVVYESKFRNWSGYSDFDRGAYVVTFVPSWNTAPDKVTQGWP (SEQ ID
NO:20)**

[156] 实施例 4: SYJS001 ADC 理化性质分析鉴定

[157] 1、SYJS001 ADC 修饰率鉴定

[158] 实验步骤:

[159] 1)上样:取还原后的 ADC 反应液样品 10 μ l 上清液体上色谱柱(waters xbridge C4, 3.5 μ m, 4.6mm*250mm)

[160] 2)洗脱:流动相 A 液为 0.1%TFA 水溶液,流动相 B 液为 0.1%乙腈溶液,分别于第 0、5、8、15、20、22、25、30min 调整流动相 A 液: B 液的比例为 9:1、7:3、6.5:3.5、6:4、5.5:4.5、5:5、1:9、9:1 洗脱,控制流速为 0.8ml/min,检测波长为 280 nm。

[161] 实验结果如图 6 所示,显示 SYJS001 ADC 修饰率为 95.11%。

[162] 2、SYJS001 ADC DAR 值检测

[163] 实验步骤:

[164] 1、上样:取 10 μ g SYJS001 ADC 样品上色谱柱(Agilent PLRP-S, 5 μ m, 2.1mm*50mm)

[165] 3、洗脱:流动相 A 液为 0.1%TFA 水溶液,流动相 B 液为 0.1%乙腈溶液,分别于第 0、8、25、26、31.5min 调整流动相 A 液: B 液的比例为 7.3:2.1、6.5:3.5、5.7:4.3、0.5:9.5、7.3:2.7 洗脱,控制流速为 0.25ml/min,检测波长为 280nm;结果如图 7 所示,平均 DAR 为 2。

[166] 实施例 5: 流式检测 SYJS001 ADC 与 CLDN18.2 蛋白结合能力

[167] 本实验采用流式细胞技术检测 SYJS001 ADC 与不同种属 CLDN18.2 蛋白的结合能力。

[168] 过表达细胞株(HEK293-人 CLDN18.2, HEK293 小鼠 CLDN18.2, 食蟹猴 GLDN18.2, CHO-K1)与不同浓度的 SYJS001 ADC 样品孵育后,用结合 IgG 的二抗(羊抗人 IgG (H+L) 交叉吸附二抗)孵育,通过流式细胞仪检测不同浓度下的荧光信号值分析样品对不同种属 CLDN18.2 的结合能力。

[169] 具体实验步骤:

[170] 蛋白样品 SYJS001 ADC 起始浓度为 45 μ g/ml, 3 倍梯度稀释,共稀释 11 个梯度。取不同浓度的抗体 100 μ l 分别与表达人、小鼠、食蟹猴 CLDN18.2 的细胞(1×10^6 细胞/ml, 100 μ l/孔)于 4°C 孵育 1.5h,清洗细胞去除未结合样品,加入羊抗人 IgG (H+L) 交叉吸附二抗(1:1000 稀释)于 4°C 孵育 1h,清洗后采用流式细胞仪进行检测对应孔的荧光信号值;用 GraphPad Prism 5 软件对数据进行分析;选择四参数方程的回归模型做“S”型曲线,软件自动生成半数有效量 ED₅₀ (C 值);实验结果如图 8 及表 3 所示,显示 SYJS001 ADC 对人、小鼠、食蟹猴 CLDN18.2 都具有良好亲和力。

[171] 表 3. SYJS001 ADC 与不同种属 CLDN18.2 结合的 ED₅₀ 值

样品名	ED ₅₀ (ng/ml)
-----	--------------------------

HEK293-人 CLDN18.2	439.1
HEK293-小鼠 CLDN18.2	717.0
食蟹猴 CLDN18.2 CHO-K1	647.9

[172] 实施例 6: SYJS001 ADC 与 CLDN18.2 的特异性结合

[173] 6.1. SYJS001 单抗与 CLDN18 家族成员的特异性以及交叉作用

[174] 用相对应的完全培养基分别培养 CHOK1-CLDN18.2 和 HEK293-CLDN18.1 细胞, 2-3 天进行传代; 细胞融汇度达到 90% 时, 用完全培养基调整细胞密度为 $2-3 \times 10^6$ 细胞/mL, 用多道移液器向流式 96 孔检测板上接入细胞悬液, 每孔 100 μ L; 2500 rpm 离心 5min, 弃上清; 用 2% FBS/PBS 洗涤两次; 将 SYJS001 单抗用 2% FBS/PBS 缓冲液进行稀释, 裸抗的起始浓度为 6 μ g/ml, 3 倍梯度稀释, 共 8 个梯度, 每个药物浓度设置 2 个复孔, 并设置相应的空白对照。每孔 100 μ L, 4°C 孵育 2 h; 用 2% FBS/PBS 洗涤三次, 加入 488 标记的羊抗人 IgG (1: 5000 稀释), 4°C 孵育 1 h; 用 2% FBS/PBS 洗涤三次, 然后选择相对应的荧光通道进行读数。

[175] 6.2 SYJS001 ADC 与 CLDN18.2 的特异性结合

[176] 用相对应的完全培养基培养 HEK293-CLDN18.2 细胞, 2-3 天进行传代; 细胞融汇度达到 90% 时, 用完全培养基调整细胞密度为 $2-3 \times 10^6$ 细胞/mL, 用多道移液器向流式 96 孔检测板上接入细胞悬液, 每孔 100 μ L; 2500 rpm 离心 5min, 弃上清; 用 2% FBS/PBS 洗涤两次; 将 SYJS001 单抗和 SYJS001 ADC 分别用 2% FBS/PBS 缓冲液进行稀释, ADC 的起始浓度为 15 μ g/ml, 3 倍梯度稀释, 共 11 个梯度, 每个药物浓度设置 2 个复孔, 并设置相应的空白对照。每孔 100 μ L, 4°C 孵育 2 h; 用 2% FBS/PBS 洗涤三次, 加入 488 标记的羊抗人 IgG (1: 1000 稀释), 4°C 孵育 1 h; 用 2% FBS/PBS 洗涤三次, 然后选择相对应的荧光通道进行读数。

[177] 结果显示 (参见图 9、图 10), 本申请获得的 SYJS001 单抗能够与 CLDN18.2 发生特异性结合, 与 CLDN18.1 无明显交叉作用; 与裸抗相比, SYJS001 ADC 与 CLDN18.2 同样具有特异性结合, 且偶联毒素后对亲和力无明显影响。

[178] 实施例 7: SYJS001 ADC 的内吞作用验证实验

[179] 实验步骤:

[180] 收集 HEK293-CLDN18.2 细胞, 并使用 DMEM 完全培养基重悬细胞; 轻柔吹打重悬靶细胞数次至单细胞悬液, 使用台盼蓝染色法鉴定细胞活力和细胞计数; 调整细胞密度为 1×10^5 细胞/ml; 每孔 100 μ L 接种于共聚焦 96 孔板细胞培养皿中, 每孔的细胞接种数为 1×10^4 , 将标记 Zenon™ pHrodo™ iFL 的 SYJS001 加入到 96 孔板中, 其终浓度为 2 μ g/ml, 然后置于 37°C、5% CO₂ 培养箱条件下连续培养至 24 小时。所有图像均经激光共聚焦显微镜 20X 物镜观察并摄取图像。

[181] 实验结果如图 11 所示, 结果显示 SYJS001 ADC 在 HEK293-CLDN18.2 细胞中发生了内吞, 并且定位于酸性环境的溶酶体 (Invitrogen 公司的 Zenon™ pHrodo™ iFL IgG Labeling Reagents(Z25611)只在溶酶体的酸性环境下显示荧光, 例如: 图 11 最右侧 HEK293-CLDN18.2 图中三个方框圈出的部分在镜下显示绿色荧光点), 而在 HEK293 和 HEK293-CLDN18.1 细胞图中不发生内吞, 未观察到绿色荧光点。

[182] 实施例 8: SYJS001 裸抗及 ADC 对不同细胞生长的抑制作用

[183] 实验步骤: 收集靶细胞重悬为单细胞悬液, 台盼蓝染色法鉴定细胞活力和细胞计数; 调整细胞密度为 1×10^5 细胞/ml; 每孔 100 μ L 加至 96 孔黑色平底细胞培养板; 将稀释好的供试品每孔 20 μ L 加至已接种细胞的 96 孔黑色平底细胞培养板; 置于细胞培养箱 (37°C, 5% CO₂) 孵育 66 $\pm$ 3 hr; 加入刃天青钠溶液 (w/v 0.03%), 每孔 20 μ L; 37°C 作用 3-4 h, 酶标仪 550 nm/610 nm 读取荧光值, 利用 Magellan6 或同类作图软件作图, 拟合出参考标准品和样品的半抑制浓度 IC₅₀。输出参数 C 为 IC₅₀, 单位为 ng/mL。

[184] 实验结果如图 12-17 及表 4 所示, 显示 SYJS001 ADC 在体外均能够抑制 NCI-N87-CLDN18.2 (胃癌细胞系)、KATOIII (胃癌细胞系)、NCI-H460-CLDN18.2 (肺癌细胞系)、NUGC4-CLDN18.2 (胃癌细胞系)、PATU8988S (胰腺癌细胞系)、BxPC-3-CLDN18.2 (胰腺癌细胞系) 癌细胞的生长。

[185] 表 4: SYJS001 裸抗和 SYJS001 ADC 对不同细胞的体外增殖抑制作用 (注: N/A=无抑制效果)

化合物	IC ₅₀ (ng/ml)					
细胞	NCI-N87-CLDN18.2	KATOIII	NCI-H460-CLDN18.2	NUGC4-CLDN18.2	PATU8988S	BxPC-3-CLDN18.2
SYJS001 ADC	7.04±2.67	60526±11976.97	456.94±24.70	228.07±43.95	769220±11512	28.03±0.89
SYJS001 单抗	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

[186] 由此可见, SYJS001 ADC 针对过表达 CLDN18.2 的胃癌细胞、肺癌细胞、人胰腺癌细胞均有显著的抑制作用, 对不表达或低表达 CLDN18.2 的人胃癌细胞 KATOIII 和人胰腺癌细胞 PATU8988S 抑制作用较弱。

[187] 实施例 9: SYJS001 ADC 的体内药效评价

[188] 9.1 以吉西他滨和顺铂为对照的药效比较数据

[189] 1) 本实验选用人胰腺癌 Bxpc3-18.2 裸小鼠移植瘤模型, 待肿瘤体积长至约 100 mm³ (接种后第 39 天) 时, 挑选肿瘤生长良好的 48 只动物, 将动物按肿瘤体积均衡分为 6 组 (第 0 天), 每组 8 只, 分别静脉给予 0.9% 氯化钠注射液 (0.9% INJ NS, 溶剂对照组), SYJS001-ADC 2、4 和 8 mg/kg (单次给药), SYJS001-mAb (SYJS001 裸抗) 8 mg/kg (单次给药) 以及吉西他滨 (Gemcitabine, GEM) 50 mg/kg (biw×4, 每周 2 次, 共 4 周)。每周测 2 次瘤径, 并称量小鼠体重, 记录数据, 通过测量给药后不同时间的肿瘤瘤径, 动态观察肿瘤的生长情况。第 28 天实验结束, 用二氧化碳窒息小鼠后, 剥瘤称量瘤重。

[190] 结果显示: 本实验中, SYJS001-ADC 2、4 和 8 mg/kg (单次给药) 组, SYJS001-mAb 8 mg/kg (单次给药) 组以及 Gemcitabine 50 mg/kg (biw×4) 组的瘤重抑制率分别为 56.6%, 94.8%, 97.8%, -36.2%, 51.0%。与溶剂对照组 (0.9% 氯化钠注射液) 相比, SYJS001-ADC 2、4 和 8 mg/kg (单次给药) 组和 GEM 50 mg/kg (biw×4: 一周两次给药, 一共给药四次) 组均能显著抑制肿瘤的生长 (P<0.01)。与阳性对照 GEM 50 mg/kg (biw×4) 组相比, SYJS001-ADC 4 和 8 mg/kg (单次给药) 组对肿瘤的抑制作用更显著, 特别是 8mg/kg 组, 抑制作用是近 2 倍 (p<0.001) (参见图 18)。

[191] 2) 本实验选用人胃癌 NUGC-4-18.2 构建裸小鼠移植瘤模型, 待肿瘤体积至约 120 mm³ (接种后第 6 天) 时, 挑选肿瘤生长良好的 64 只动物, 将动物按肿瘤体积均衡分为 8 组 (第 0 天), 每组 8 只动物, 分别静脉给予 0.9% 氯化钠注射液 (0.9% INJ NS, 溶剂对照组); SYJS001-ADC 1、2、4 mg/kg (qw×3); 4, 8 mg/kg (单次给药); SYJS001-mAb 4 mg/kg (qw×3); 顺铂 (Cisplatin) 6 mg/kg (qw×3, 每周 1 次, 共 3 周)。每周测 2 次瘤径, 并称量小鼠体重, 记录数据, 通过测量给药后不同时间的肿瘤瘤径, 动态观察肿瘤的生长变化。第 20 天结束实验, 动物二氧化碳窒息后, 剥瘤称量瘤重。

[192] 结果显示: 本实验中, SYJS001-ADC 1、2、4 mg/kg (qw×3); 4, 8 mg/kg (单次给药); SYJS001-mAb 4 mg/kg (qw×3); 顺铂 6 mg/kg (qw×3) 的瘤重抑制率分别为 98.0%, 100%, 100%; 100%, 100%; -1.2%; 66.5%。与溶剂对照组相比: 除 SYJS001-mAb 4 mg/kg (qw×3) 组外其余各组均能显著抑制肿瘤的生长 (P<0.001); SYJS001-ADC 1, 2, 4 mg/kg (qw×3); 4, 8 mg/kg (单次给药) 组在药效和毒性方面均显著优于阳性对照组 Cisplatin 6 mg/kg (qw×3) (P<0.05) (参见图 19)。

[193] 9.2 以 IMAB362-ADC 为对照的比较药效数据

[194] IMAB362 (也称为克劳地昔单抗, Zolbetuximab)是一种已报道的 IgG1 亚型的嵌合单克隆抗体,其选择性靶向 CLDN18.2 的第一胞外结构域,且对 CLDN18.1 具有很小的活性,在本实验中被选为对照抗体。

[195] 1)本实验选用人胰腺癌 Bxpc3-18.2 裸小鼠移植瘤模型,待肿瘤体积长至约 100 mm³(接种后第 39 天)时,挑选肿瘤生长良好的 64 只动物,将动物按肿瘤体积均衡分为 8 组(第 0 天),每组 8 只,分别静脉给予 0.9%氯化钠注射液(0.9% INJ NS,溶剂对照组),SYJS001-ADC 2、4 和 8 mg/kg(单次给药),IMAB362-ADC(IMAB362 序列参考专利 CN201680021997.6,基因合成在南京金斯瑞生物科技有限公司完成,蛋白表达利用珠海恺瑞生物科技有限公司的 KOP293 瞬时转染蛋白表达系统进行瞬转表达,具体步骤见其官网。IMAB362-ADC 的制备参考实施例 3 SYJS001 ADC 制备的方法)2、4 和 8 mg/kg(单次给药),SYJS001-mAb 8 mg/kg(单次给药)。每周测 2 次瘤径,并称量小鼠体重,记录数据,通过测量给药后不同时间的肿瘤瘤径,动态观察肿瘤的生长情况。第 28 天实验结束,用二氧化碳窒息小鼠后,剥瘤称量瘤重。

[196] 结果显示:本实验中,SYJS001-ADC 2、4 和 8 mg/kg(单次给药)组,SYJS001-mAb 8 mg/kg(单次给药)组以及 IMAB362-ADC 2、4 和 8 mg/kg(单次给药)组的肿瘤体积分别为溶剂对照组的 35.9%、6.0%、3.4%、116.2%、47.0%、6.8%、5.1%。与溶剂对照组相比,SYJS001-ADC 2、4 和 8 mg/kg(单次给药)组和 IMAB362-ADC 2、4 和 8 mg/kg(单次给药)均能显著抑制肿瘤的生长($p < 0.01$)。与阳性对照 IMAB362-ADC 组相比,高剂量下效果相差不多,但在低剂量(起效剂量)条件下,SYJS001 ADC 的体内抑瘤作用要明显好于 IMAB362-ADC,具体参见图 20(RTV(relative tumor volume),相对肿瘤体积)。

[197] 根据 Chunze Li 2019 公布的数据(Clinical pharmacology of vc-MMAE antibody-drug conjugates in cancer patients :learning from eight first-in-human Phase 1 studies 2019 vol.12, No.1, MABS),基于 VC-MMAE 的 ADC 临床施药剂量区间一般在 0.1-3.2mg,因此,本实验的低剂量为更有临床应用前景的剂量,SYJS001-ADC 的临床前景和成药性优于 IMAB362-ADC。

[198] 2)本实验选用人胃癌 NUGC-4-18.2 构建裸小鼠移植瘤模型,待肿瘤体积至约 120 mm³(接种后第 6 天)时,挑选肿瘤生长良好的 64 只动物,将动物按肿瘤体积均衡分为 8 组(第 0 天),每组 8 只动物,分别静脉给予 0.9%氯化钠注射液(0.9%INJ NS,溶剂对照组)SYJS001-ADC 0.5、1、2、4 mg/kg(单次给药);IMAB362-ADC 0.5、1、2、4 mg/kg(单次给药);SYJS001-mAb 4 mg/kg(单次给药);每周测 2 次瘤径,并称量小鼠体重,记录数据,通过测量给药后不同时间的肿瘤瘤径,动态观察肿瘤的生长变化。第 20 天结束实验,动物二氧化碳窒息后,剥瘤称量瘤重。

[199] 结果显示:本实验中,SYJS001-ADC 0.5、1、2、4 mg/kg(单次给药);IMAB362-ADC 0.5、1、2、4 mg/kg(单次给药);SYJS001-mAb 4 mg/kg(单次给药)的肿瘤体积分别为溶剂对照组的 59.1%、27.3%、1.8%、0%、68.2%、30%、1.8%、0%、83.6%。与溶剂对照组相比:除 SYJS001-mAb 4 mg/kg 组外其余各组均能显著抑制肿瘤的生长($p < 0.001$);SYJS001 ADC 对 NUGC4-CLDN18.2 的体内抑瘤作用在高剂量下效果与 IMAB362-ADC 相差不多,但在低剂量(起效剂量)条件下,SYJS001 ADC 的体内抑瘤作用要明显优于 IMAB362-ADC(参见图 21)。

[200] 与上一比较实验的情形类似,本实验的低剂量为更有临床应用前景的剂量,SYJS001-ADC 的临床前景和成药性明显优于 IMAB362-ADC。

[201] 实施例 10: MMAE 释放与旁观者效应实验

[202] 阳性组 BxPC-3-CLDN18.2 和 HEK293-Luc 细胞(不表达 CLDN18.2 的细胞)与 SYJS001 ADC 共培养 4 天后,通过化学发光显色来指示混合细胞中的 HEK293-Luc 的数量,与阴性组 BxPC-3 和 HEK293-Luc 共培养组相比,3 个浓度点包括:5 μ g/ml、1 μ g/ml,以及 200 ng/ml

均能够不同程度的引起 HEK293-Luc 细胞增殖抑制；这表明阳性组 BxPC-3-Human CLDN18.2 能够与 SYJS001 ADC 结合，然后通过内吞作用进入到细胞内，在细胞内释放的 MMAE 能够实现 BxPC-3-人 CLDN18.2 的凋亡，细胞凋亡裂解后释放的 MMAE 能够引起旁观细胞的生长抑制，具体结果详见图 22。由此可见，MMAE 能够高效地从 SYJS001 ADC 中释放，并且由于其膜通透性而对邻近细胞发挥细胞毒活性，产生旁观者效应。

[203] 综合以上多个实施例的结果可知，本申请获得的抗 CLDN18.2 的单克隆抗体可在 CLDN18.2 阳性细胞特异性结合 CLDN18.2 并高效内化，并且本申请获得的 ADC 药物对以胰腺癌、胃癌、肺癌为代表的肿瘤细胞具有极强的杀伤作用。

[204] 实施例 11: ADC 稳定性研究

[205] 11.1 血浆和血清稳定性

[206] 本实验研究目的是 SYJS001-ADC 在不同种属（人、食蟹猴和 SD 大鼠）的血浆和血清中的体外代谢稳定性。SYJS001-ADC 孵育浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，37°C 无菌条件下温孵 0-168 h（7 天）。采用 LC-MS/MS 方法检测 MMAE 的浓度，MMAE 在 0.5% BSA-PBS、人血浆、食蟹猴血浆和 SD 大鼠血浆的浓度结果如表 5-表 8 所示，随着温孵时间的增加，所有基质中均有游离 MMAE 的生成；SYJS001-ADC 在 37°C 条件下，温孵 168 h（7 天）后，在 0.5% BSA-PBS、人血浆、食蟹猴血浆和 SD 大鼠血浆中脱落率百分比分别为 0.672%、0.327%、0.209% 和 0.405%。实验表明 MMAE 在 SYJS001-ADC 上脱落率均不足 1.0%，表明 SYJS001-ADC 在 0.5% BSA-PBS、人血浆、食蟹猴血浆和 SD 大鼠血浆均比较稳定。

[207] 表 5. MMAE 在 0.5% BSA-PBS 溶液的游离浓度以及在 ADC 上的脱落率

	时间 (h)	浓度 (ng/mL)			平均值	标准差	脱落率 (%)
		1	2	3			
0.5%BSA-PBS	0	0.167	0.179	0.154	0.167	0.013	0.017
	8	0.662	0.635	0.682	0.660	0.024	0.069
	24	1.687	1.791	1.711	1.730	0.054	0.181
	48	2.808	2.732	2.871	2.804	0.070	0.293
	72	3.485	3.536	3.457	3.493	0.040	0.365
	96	4.532	4.446	4.238	4.405	0.151	0.460
	168	5.51	6.846	6.951	6.436	0.803	0.672

[208] 表 6. MMAE 在人血浆中游离的浓度及在 ADC 上的脱落率

	时间 (h)	浓度 (ng/mL)			平均值	标准差	脱落率 (%)
		1	2	3			
人血浆	0	BQL	BQL	BQL	BQL	NA	NA
	8	0.105	0.106	0.097	0.103	0.005	0.011
	24	0.39	0.33	0.31	0.343	0.042	0.036
	48	0.695	0.713	0.631	0.680	0.043	0.071
	72	1.05	1.045	0.932	1.009	0.067	0.105
	96	1.398	1.34	1.193	1.310	0.106	0.137
	168	3.017	3.122	3.238	3.126	0.111	0.327

[209] 表 7. MMAE 在猴血浆中游离的浓度及在 ADC 上的脱落率

	时间 (h)	浓度 (ng/mL)			平均值	标准差	脱落率 (%)
		1	2	3			
猴血浆	0	BQL	BQL	BQL	BQL	NA	NA
	8	0.118	0.137	0.138	0.131	0.011	0.014

24	0.304	0.25	0.299	0.284	0.030	0.030
48	0.549	0.556	0.543	0.549	0.007	0.057
72	0.773	0.773	0.671	0.739	0.059	0.077
96	1.042	0.971	0.978	0.997	0.039	0.104
168	1.97	2.05	1.983	2.001	0.043	0.209

[210] 表 8. MMAE 在大鼠血浆中游离的浓度及在 ADC 上的脱落率

	时间 (h)	浓度 (ng/mL)			平均值	标准差	脱落率 (%)
		1	2	3			
大鼠血浆	0	BQL	BQL	BQL	BQL	NA	NA
	8	0.24	0.217	0.2	0.219	0.020	0.023
	24	0.565	0.537	0.532	0.545	0.018	0.057
	48	1.064	1.002	1.042	1.036	0.031	0.108
	72	1.498	1.393	1.538	1.476	0.075	0.154
	96	2.09	2.009	1.883	1.994	0.104	0.208
	168	4.041	3.801	3.793	3.878	0.141	0.405

[211] 11.2 加速稳定性

[212] 将 SYJS001-ADC 在 2°C 至 8°C 下储存在缓冲液中 (其成分包括: w/v 5% L-组氨酸、25% L-组氨酸盐酸盐), 放置不同时间, 检测其稳定性, 结果如下表。IMAB362-ADC (IMAB362-vcMMAE) 在 28 天游离毒素达到 0.3% (参见 CN 107667118A 表 7), 远远高于本申请药物 SYJS001-ADC 3 个月的 0.000026%, 说明 SYJS001-ADC 稳定性远优于 IMAB362-ADC。

[213] 表 9 SYJS001-ADC 加速稳定性 (6°C±2°C) 实验结果

考察项目	时间 (月) - SYJS001-ADC			
	0 月	1 月	2 月	3 月
DAR 分布	DAR: 2.01	2.01	2.00	2.00
	DAR2: 76.80%	77.83%	78.50%	77.29%
游离 MMAE	0.000012%	0.000018%	0.000020%	0.000026%
游离 L&D	< 0.004%	< 0.004%	< 0.004%	< 0.004%

[214] 实施例 12: SYJS001 与 IMAB362 比较研究

[215] 12.1 亲和力

[216] 使用 PBS 缓冲液重悬 CLDN18.2 高表达细胞株 BxPC3-CLDN18.2, 将细胞调整至 1×10⁶ 细胞/ml, 每孔 100 μl 加至 96 孔 V 型培养板; 2500 rpm 离心 5 min, 弃上清; 使用实验缓冲液对样品进行稀释, 抗体的起始浓度为 40 μg/ml, 5 倍梯度稀释, 共 10 个梯度; 将稀释好样品每孔 100 μl 加入 96 孔 V 型培养板, 并将其置于 4°C 孵育 60~90 分钟; 孵育结束后, 将 V 型培养板放入离心机中, 2500 rpm 离心 5 min; 小心甩去离心上清液, 加入 100 μl PBS 重悬细胞, 2500 rpm 离心 5 min; 重复操作两次; 小心甩去离心上清液, 根据实验排布加入荧光抗体检测试剂 (1:1000 稀释), 4°C 避光孵育 30~60 分钟; 孵育结束后, 将 V 型培养板放入高速离心机中, 2500 rpm 离心 5 min; 小心甩去离心上清液, 加入 100 μl 实验缓冲液重悬细胞, 之后采用流式细胞仪进行检测使用板式读数读取实验板中对应孔的荧光信号值; 导出实验数据, 采用 GraphPad Prism 5 软件对数据进行分析; 选择四参数方程的回归模型做“S”型曲

线, 软件自动生成半数有效量 ED50 (C 值), 结果如下图 (图 23, MFI: 平均荧光强度) 所示, SYJS001 的亲合力高于 IMAB362 的 2 倍多。

[217] 12.2 抗原表位分析

[218] 用 Octet 表位配对来检测 SYJS001-ADC 和 IMAB362-ADC 的抗原表位竞争, 将 5 µg/ml 人 CLDN18.2 蛋白固化在 HIS1K 捕获传感器, Loading 180 s; 将两个抗体分别稀释至 100 nM, 固化后的传感器先与其中一个抗体结合 (Association) 180 s, 再与第二个抗体结合 (Association) 180 s, 检测第二个抗体结合信号以判定两个抗体是否识别同一表位。结果: 60%-100%: 完全不竞争; 20%-60%: 部分竞争; <20%: 完全竞争, 则认为两个抗体有竞争。结果如下表 (表 10) 所示, SYJS001-ADC 和 IMAB362-ADC 表位完全竞争。

[219] 表 10

	SYJS001	IMAB362
SYJS001	9.02%	7.98%
IMAB362	7.88%	6.6%

[220] 12.3 内吞检测

[221] 将 BxPC3-CLDN18.2 细胞接种于 6 孔板, 每孔细胞数约 $4-6 \times 10^5$ 细胞; 转移至培养箱中, 37°C, 5%CO₂ 培养过夜; 用完全培养基 (DMEM (Hyclone, 货号: SH30243.01) +10% FBS (Gibco, 货号: 10091-148) +1 µg/ml 的嘌呤霉素 (Gibco, 货号: A11138-02)) 将抗体稀释至 5µg/ml, 弃掉 6 孔板的原有培养基, 每孔加入 2 ml 含有抗体的完全培养基; 4°C 放置 2 hr, 然后弃掉上清, 用完全培养基清洗两次, 每孔加入 2 ml 不含抗体的完全培养基; 除去此时取 2-3 个复孔, 进行胰酶消化, 此时间点作为细胞结合的抗体总量; 其余细胞转移至培养箱中, 37°C, 5% CO₂ 培养箱放置 4hr、21hr、25hr、48hr 进行内吞; 对每个时间点胰酶消化的细胞进行洗涤后, 加入荧光抗体检测试剂 (1:1000 稀释), 4°C 避光孵育 60 分钟; 小心甩去离心上清液, 两次清洗后, 采用流式细胞仪进行检测荧光信号值;

[222] 内吞率计算公式: (总抗体荧光信号-不同时间点荧光信号) /总抗体荧光信号×100% 结果如下图 (图 24, MFI: 平均荧光强度), SYJS001 在初期 (0-21hr) 内吞速率显著高于 IMAB362-ADC, 在 21-48hr, 与 IMAB362-ADC 基本一致。在其他条件相同的情况下, 内吞速率快, 药物进入肿瘤细胞的能力强, 可以更好的释放毒性分子, 客观上起到更快起效的作用。因此预期 SYJS001 相对于 IMAB362-ADC 起效更快。

[223] 12.4 体外细胞增长抑制实验

[224] 1. 腺癌细胞模型

[225] 收集 BxPC-3-CLDN18.2 细胞, 并使用完全培养基 (同 12.3 内吞检测部分使用的完全培养基) 重悬细胞; 轻柔吹打重悬靶细胞数次至单细胞悬液, 使用台盼蓝染色法鉴定细胞活力和细胞计数; 调整细胞密度为 1×10^5 细胞/ml; 每孔 100 µl 加至 96 孔黑色平底细胞培养板; 抗体的起始浓度为 5µg/ml, 2 倍梯度稀释, 共 11 个梯度; 将稀释好的供试品每孔 20 µl 加至已接种细胞的 96 孔黑色平底细胞培养板; 抗体和细胞共培养, 置于细胞培养箱 (37°C, 5%CO₂) 孵育 63-69 hr; 待孵育结束后, 加入刃天青钠溶液 (w/v 0.03%), 每孔 20 µl; 37°C 作用 3-4 h, 酶标仪 550 nm/610 nm 读取荧光值, 利用 Magellan6 或同类作图软件作图, 拟合出参考标准品和样品的半抑制浓度 IC₅₀。输出参数 C 为 IC₅₀, 单位为 ng/mL。结果如下图 (图 25, RLU: 相对发光单位) 所示, SYJS001-ADC 对 BxPC-3-CLDN18.2 细胞的体外抑制效果显著优于 IMAB362-ADC。

[226] 2. 胃癌细胞模型

[227] 收集 NUGC4-CLDN18.2 细胞, 并使用完全培养基 (同 12.3 内吞检测部分使用的完全培养基) 重悬细胞; 轻柔吹打重悬靶细胞数次至单细胞悬液, 使用台盼蓝染色法鉴定细胞活力和细胞计数; 调整细胞密度为 1×10^5 细胞/ml; 每孔 100 µl 加至 96 孔黑色平底细胞培养板; 抗体的起始浓度为 10 mg/ml, 5 倍梯度稀释, 共 11 个梯度; 将稀释好的供试品每孔 20 µl 加至已接种细胞的 96 孔黑色平底细胞培养板; 抗体和细胞共培养, 置于细胞培养箱 (37°C,

5%CO₂) 孵育 63-69 hr; 待孵育结束后, 加入刃天青钠溶液 (w/v 0.03%), 每孔 20 μ l; 37°C 作用 3-4 h, 酶标仪 550 nm/610 nm 读取荧光值, 利用 Magellan6 或同类作图软件作图, 拟合出参考标准品和样品的半抑制浓度 IC₅₀。输出参数 C 为 IC₅₀, 单位为 ng/mL。结果如下图 (图 26, RLU: 相对发光单位) 所示, SYJS001-ADC 对 NUGC4-CLDN18.2 细胞的体外抑制效果优于 IMAB362-ADC, 超过其 2 倍。

[228] 综合以上实验, 本申请获得的 SYJS001-ADC 在稳定性、相关抗体亲和力、内吞效率以及体外和体内肿瘤细胞抑制方面均明显由于对照 IMAB362-ADC。

[229] 以上描述地仅是优选实施方案, 其只作为示例而不限实施本申请所必需特征的组合。所提供的标题并不意指限制本申请的多种实施方案。术语例如“包含”、“含”和“包括”不意在限制。此外, 除非另有说明, 没有数词修饰时包括复数形式, 以及“或”、“或者”意指“和/或”。除非本文另有定义, 本文使用的所有技术和科学术语的意思与本领域技术人员通常理解的相同。本申请中提及的所有公开物和专利通过引用方式并入本文。不脱离本申请的范围和精神, 本申请的所描述的方法和组合物的多种修饰和变体对于本领域技术人员是显而易见的。虽然通过具体的优选实施方案描述了本申请, 但是应该理解所要求保护的本申请不应该被不适当地局限于这些具体实施方案。事实上, 那些对于相关领域技术人员而言显而易见的用于实施本申请的所描述的模式的多变体意在包括在随附的权利要求的范围内。

权利要求书

1. 缀合物，其包含与一个或多个药物分子偶联的抗体或其抗原结合片段，所述抗体包含重链和轻链，其中所述重链包含分别具有如 SEQ ID NO:1、2 和 3 所示的氨基酸序列的三个 CDR 区，和/或所述轻链包含分别具有如 SEQ ID NO:4、5 和 6 所示的氨基酸序列的三个 CDR 区。
2. 如权利要求 1 所述的缀合物，其中所述抗体为单克隆抗体或双特异性抗体，优选为单克隆抗体，更优选为人源化抗体，最优选为全人源抗体。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的缀合物，其中所述抗体为 IgG 型抗体，优选为 IgG1 型抗体。
4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的缀合物，其中所述抗原结合片段为 Fab 片段、F(ab')₂ 片段或单链 Fv 片段(scFv)。
5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的缀合物，其中所述重链包含如 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列的重链可变区，和/或所述轻链包含如 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列的轻链可变区。
6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的缀合物，其中所述重链包含如 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列的重链，和/或所述轻链包含如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列的轻链。
7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的缀合物，其中所述药物分子为抗癌药物，例如，细胞毒性药物、免疫增强剂或放射性同位素。
8. 如权利要求 7 所述的缀合物，其中所述细胞毒性药物选自微管蛋白抑制剂、DNA 拓扑异构酶抑制剂、DNA 损伤剂、抗代谢药或抗肿瘤抗生素。
9. 如权利要求 8 所述的缀合物，其中所述微管蛋白抑制剂选自奥瑞斯他汀衍生物（例如 MMAE(Monomethyl auristatin E)、MMAF (Monomethyl auristatin F)）或美登素生物碱衍生物（例如 DM1、DM4、安丝菌素(Ansamitocin)、美登素(Mertansine)或海兔毒素肽(dolastatin)及其衍生物)。
10. 如权利要求 8 所述的缀合物，其中所述 DNA 拓扑异构酶抑制剂选自喜树碱类似物或 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂及其衍生物，例如，DXD、SN38、伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、22-羟基早莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氟基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氟基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吡咯并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]吡唑-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吡啶甲酰胺。
11. 如权利要求 8 所述的缀合物，其中所述 DNA 损伤剂选自卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD(pyrrolobenzodiazepine, 吡咯并苯并二氮杂)。
12. 如权利要求 7 所述的缀合物，其中所述免疫增强剂选自左旋咪唑(levamisole)、匹多莫德(pidotimod)、咪喹莫特(imiquimod)、异丙肌苷、聚肌胞苷酸或聚肌尿苷酸；和/或所述抗代谢药选自甲氨蝶呤、6-巯嘌呤或 5-氟尿嘧啶；和/或所述抗肿瘤抗生素选自多肽类抗生素（例如放线菌素 D 或博来霉素）或蒽醌类药物（例如阿霉素或盐酸米托蒽醌）。
13. 如权利要求 7 所述的缀合物，其中所述放射性同位素选自 ²¹¹At、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sm、²¹²Bi、³²P、⁶⁰Co 或 ¹⁷⁷Lu。
14. 如权利要求 1-13 中任一项所述的缀合物，其中所述药物分子与所述抗体或其抗原结合片段通过接头偶联，所述接头与所述抗体或其抗原结合片段通过巯基或氨基连接。
15. 如权利要求 14 所述的缀合物，其中所述接头选自 mc-Val-Cit-pAB、mc-Val-Cit-pABC、mc-Val-Cit、NH₂-(PEG)m-Val-Cit、NH₂-(PEG)m-Val-Cit-pAB，其中 m 为 1 至 8 的整数。
16. 如权利要求 14 所述的缀合物，其中所述缀合物的结构为 Ab-(L-U)_n，其中 Ab 表示抗体或其抗原结合片段，L 表示所述接头，U 表示所述药物分子，并且 n 为 1 至 8 的整数或小

数。

17. 药物组合物，其包含权利要求 1 至 16 中任一项所述的缀合物，以及可药用载体。
18. 如权利要求 17 所述的药物组合物，其中所述药物组合物用于治疗或预防癌症。
19. 如权利要求 18 所述的药物组合物，其中所述癌症为 CLDN18.2 阳性癌症。
20. 如权利要求 18 或 19 所述的药物组合物，其中所述癌症为胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌或胆囊癌。
21. 如权利要求 18-20 中任一项所述的药物组合物，其中所述癌症为胃、食管、胰管、胆管、肺或卵巢的腺癌。
22. 如权利要求 18-21 中任一项所述的药物组合物，其中所述癌症为胃癌或胰腺癌。
23. 权利要求 1 至 16 中任一项所述的缀合物或权利要求 17 所述的药物组合物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。
24. 如权利要求 23 所述的用途，其中所述癌症为 CLDN18.2 阳性癌症。
25. 如权利要求 23 或 24 所述的用途，其中所述癌症为胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌或胆囊癌。
26. 如权利要求 23-25 中任一项所述的用途，其中所述癌症为胃、食管、胰管、胆管、肺或卵巢的腺癌。
27. 如权利要求 23-26 中任一项所述的用途，其中所述癌症为胃癌或胰腺癌。
28. 治疗个体中癌症的方法，包括将治疗有效量的权利要求 1 至 16 中任一项所述的缀合物或权利要求 17 所述的药物组合物施用于患有所述癌症的个体。
29. 如权利要求 28 所述的方法，其中所述癌症为 CLDN18.2 阳性癌症。
30. 如权利要求 28 或 29 所述的方法，其中所述癌症为胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌或胆囊癌。
31. 如权利要求 28-30 中任一项所述的方法，其中所述癌症为胃、食管、胰管、胆管、肺或卵巢的腺癌。
32. 如权利要求 28-31 中任一项所述的方法，其中所述癌症为胃癌或胰腺癌。
33. 医用制品，其包含权利要求 1 至 16 中任一项所述的缀合物或权利要求 17 所述的药物组合物。
34. 权利要求 33 所述的医用制品，其以药盒的形式存在，所述药盒包含容纳权利要求 1 至 16 中任一项所述的缀合物或权利要求 17 所述的药物组合物的容器。
35. 权利要求 1-16 任一项所述的缀合物与抗增生剂在制备治疗肿瘤药物中的用途。
36. 药物组合物，包含权利要求 1-16 任一项所述的缀合物和抗增生剂。
37. 治疗个体中肿瘤的方法，包括将治疗有效量的权利要求 1 至 16 中任一项所述的缀合物或权利要求 17 所述的药物组合物与抗增生剂施用于患有所述肿瘤的个体。
38. 如权利要求 35 所述的用途或权利要求 36 所述的药物组合物或权利要求 37 所述的方法，其中所述抗增生剂选自紫杉醇、多柔比星、多西他赛、顺铂、卡铂或异丙铂。