

抗体药物偶联物及其应用

技术领域

5 本发明涉及药物化学领域，具体地，涉及抗体药物偶联物及其应用。

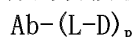
背景技术

胃癌是世界范围内最常见的癌症之一，其中东亚、东欧和南美洲胃癌发病率较高，北美和非洲发病率较低。晚期或复发胃癌标准初始治疗是化疗。尽管由于手术技术以及围手术治疗的发展，胃癌患者的预后已经显著改善，但是其5年总生存率仅为10-15%。靶向治疗为复发/晚期胃癌治疗带来了新的希望，将曲妥珠单抗联合化疗可为有HER2阳性的患者带来一定获益，但只有15%的患者有HER2阳性表达，受益人群有限。近年来，免疫治疗给复发/晚期胃癌治疗带来了新的希望；但是根据KEYNOTE-12研究的结果，适用该治疗的PD-L1阳性人群比率也仅占复发/晚期胃或胃食管结合部腺癌患者的40%左右。因此，开发新的胃癌治疗药物仍然迫在眉睫。

发明内容

本申请的发明人通过大量实验和创造性劳动，制备得到了抗Claudin 18.2抗体药物偶联物，并证实其具有良好的生物学活性，由此完成了本发明。

20 为此，在本发明的第一方面，本发明提供了抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，所述抗体药物偶联物具有式I所示的结构，



式 I

其中：

25 Ab为抗Claudin 18.2抗体，所述抗Claudin 18.2抗体包含重链和轻链，重链可变区CDR1包含选自SEQ ID NO: 2、10、18、26、34、42、68、76、84、92、100、108或116所示的序列或其突变体，重链可变区CDR2包含选自SEQ ID NO: 3、11、19、27、35、43、69、77、85、93、101、109或117所示的序列或其突变体，重链可变区CDR3包含选自SEQ ID NO: 4、12、20、28、36、44、70、78、86、94、102、110或118所示的序列或其突变体，

30 轻链可变区CDR1包含选自SEQ ID NO: 50、58、124或132所示的序列或其突变体，轻链可变区CDR2包含选自SEQ ID NO: 51、59、125或133所示的序列或其突变体，轻链可变区CDR3包含选自SEQ ID NO: 52、60、126或134所示的序列或其突变体；

D为细胞毒剂；

L为接头，用于连接所述抗Claudin 18.2抗体和所述细胞毒剂；

35 p为2.0-8.0(例如2.0-7.0、2.0-6.0、2.0-5.0、2.0-4.0、3.0-7.0、3.0-6.0、3.0-5.0或3.0-4.0，或者例如3.0、4.0、5.0、6.0或7.0)。

本发明的抗体药物偶联物在体内和体外都具有良好的抑制肿瘤细胞生长活性，具有良好的应用前景。本发明的抗体药物偶联物由抗Claudin 18.2抗体和海兔毒素的衍生物MMAE通过MC-vc-PAB链接体连接而成，其抗肿瘤作用机理为：抗体药物偶联物与肿瘤细胞表面的Claudin 18.2结合后，通过内吞进入肿瘤细胞内并运输到溶酶体，再经溶酶体内蛋白酶降解释放出MMAE，MMAE进入细胞质后与微管蛋白结合并抑制其聚合，从而阻断微管蛋白参与的包括有丝分裂在内的细胞各项生理功能，进而抑制肿瘤细胞增殖并导致肿瘤细胞死亡。

40

需要说明的是，所述“抗体药物偶联物”为含有相同或不同DAR值的ADC分子的组合物。具体地，本发明提供了包含多个ADC分子的组合物。在某些情况下，该组合物中，多个ADC分别包含相同数目的药物分子。在其他情况下，该组合物中，多个ADC分别包含不

45

同数目的药物分子。

上述药物抗体比 (DAR) 是指偶联到抗体的药物分子的个数 (例如, 式 I 中的 p)。本发明所述的抗体药物偶联物中包含的药物分子的个数 (例如, 式 I 中的 p) 通常是整数, 当本发明所述的抗体药物偶联物中包含的药物分子的个数 (例如, 式 I 中的 p) 是分数时, 该分数指的是包含多个 ADC 分子的组合物中, 每个抗体偶联的药物分子的平均数量。

上述药物抗体比 (DAR) 可以通过常规手段来验证, 诸如质谱、ELISA 测定法、HIC 和 HPLC。还可以测定 ADC 在 p 方面的定量分布。在有些情况中, 将 p 为某数值的同质 ADC 从具有其它药物载荷的 ADC 中分离、纯化和验证可以通过诸如反相 HPLC 或电泳的手段来实现。

10 在一些实施方案中, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 2、10、18、26、34 或 42 所示的序列或其突变体, 重链可变区 CDR2 包含选自 SEQ ID NO: 3、11、19、27、35 或 43 所示的序列或其突变体, 重链可变区 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 4、12、20、28、36 或 44 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 50 或 58 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 CDR2 包含选自 SEQ ID NO: 51 或 59 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 52 或 60 所示的序列或其突变体。

15 在一些实施方案中, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 68、76、84、92、100、108 或 116 所示的序列或其突变体, 重链可变区 CDR2 包含选自 SEQ ID NO: 69、77、85、93、101、109 或 117 所示的序列或其突变体, 重链可变区 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 70、78、86、94、102、110 或 118 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 124 或 132 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 CDR2 包含选自 SEQ ID NO: 125 或 133 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 126 或 134 所示的序列或其突变体。

20 在一些实施方案中, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 选自如下序列组合:

- 25 (1) SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4,
(2) SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12,
(3) SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20,
(4) SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28,
(5) SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36,
30 (6) SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44,
(7) SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70,
(8) SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 78,
(9) SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 86,
(10) SEQ ID NO: 92、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 94,
35 (11) SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 102,
(12) SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 110,
(13) SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118,

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 选自如下序列组合:

- 40 (1) SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52,
(2) SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60,
(3) SEQ ID NO: 124、SEQ ID NO: 125、SEQ ID NO: 126,
(4) SEQ ID NO: 132、SEQ ID NO: 133、SEQ ID NO: 134。

在一些实施方案中, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 选自如下序列组合:

- 45 (1) SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4,
(2) SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12,

(3) SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20,

(4) SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28,

(5) SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36,

(6) SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44,

5 所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 选自如下序列组合:

(1) SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52,

(2) SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60。

在一些实施方案中, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 选自如下序列组合:

10 (1) SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70,

(2) SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 78,

(9) SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 86,

(4) SEQ ID NO: 92、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 94,

(5) SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 102,

15 (6) SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 110,

(7) SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118,

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 选自如下序列组合:

(1) SEQ ID NO: 124、SEQ ID NO: 125、SEQ ID NO: 126,

(2) SEQ ID NO: 132、SEQ ID NO: 133、SEQ ID NO: 134。

20 在一些实施方案中, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 FR1 包含选自 SEQ ID NO: 5、13、21、29、37、45、71、79、87、95、103、111 或 119 所示的序列或其突变体, 重链可变区 FR2 包含选自 SEQ ID NO: 6、14、22、30、38、46、72、80、88、96、104、112 或 120 所示的序列或其突变体, 重链可变区 FR3 包含选自 SEQ ID NO: 7、15、23、31、39、47、73、81、89、97、105、113 或 121 所示的序列或其突变体, 重链可变区 FR4 包含选自
25 SEQ ID NO: 8、16、24、32、40、48、74、82、90、98、106、114 或 122 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR1 包含选自 SEQ ID NO: 53、61、127 或 135 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR2 包含选自 SEQ ID NO: 54、62、128 或 136 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR3 包含选自 SEQ ID NO: 55、63、129 或 137 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR4 包含选自 SEQ ID NO: 56、64、130 或 138 所示的序列或其突变体。

30 在一些实施方案中, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 FR1 包含选自 SEQ ID NO: 5、13、21、29、37 或 45 所示的序列或其突变体, 重链可变区 FR2 包含选自 SEQ ID NO: 6、14、22、30、38 或 46 所示的序列或其突变体, 重链可变区 FR3 包含选自 SEQ ID NO: 7、15、23、31、39 或 47 所示的序列或其突变体, 重链可变区 FR4 包含选自 SEQ ID NO: 8、16、24、32、40 或 48 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR1 包含选自 SEQ ID NO:
35 53 或 61、所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR2 包含选自 SEQ ID NO: 54 或 62 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR3 包含选自 SEQ ID NO: 55 或 63 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR4 包含选自 SEQ ID NO: 56 或 64 所示的序列或其突变体。

在一些实施方案中, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 FR1 包含选自 SEQ ID NO: 71、79、87、95、103、111 或 119 所示的序列或其突变体, 重链可变区 FR2 包含选自 SEQ
40 ID NO: 72、80、88、96、104、112 或 120 所示的序列或其突变体, 重链可变区 FR3 包含选自 SEQ ID NO: 73、81、89、97、105、113 或 121 所示的序列或其突变体, 重链可变区 FR4 包含选自 SEQ ID NO: 74、82、90、98、106、114 或 122 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR1 包含选自 SEQ ID NO: 127 或 135 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR2 包含选自 SEQ ID NO: 128 或 136 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR3 包含选自 SEQ ID
45 NO: 129 或 137 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR4 包含选自 SEQ ID NO: 130 或 138 所示的序列或其突变体。

在一些实施方案中, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 选自如下序列组合:

- 5 (1) SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8,
(2) SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16,
(3) SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24,
(4) SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32,
(5) SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40,
(6) SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 48,
(7) SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74,
10 (8) SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 82,
(9) SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 90,
(10) SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 97、SEQ ID NO: 98,
(11) SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106,
(12) SEQ ID NO: 111、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 113、SEQ ID NO: 114,
15 (13) SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 122,

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 选自如下序列组合:

- (1) SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56,
(2) SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64,
(3) SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 128、SEQ ID NO: 129、SEQ ID NO: 130,
20 (4) SEQ ID NO: 135、SEQ ID NO: 136、SEQ ID NO: 137、SEQ ID NO: 138.

在一些实施方案中, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 选自如下序列组合:

- (1) SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8,
(2) SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16,
25 (3) SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24,
(4) SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32,
(5) SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40,
(6) SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 48,

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 选自如下序列组合:

- 30 (1) SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56,
(2) SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64.

在一些实施方案中, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 选自如下序列组合:

- (1) SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74,
35 (2) SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 82,
(3) SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 90,
(4) SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 97、SEQ ID NO: 98,
(5) SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106,
(6) SEQ ID NO: 111、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 113、SEQ ID NO: 114,
40 (7) SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 122,

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 选自如下序列组合:

- (1) SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 128、SEQ ID NO: 129、SEQ ID NO: 130,
(2) SEQ ID NO: 135、SEQ ID NO: 136、SEQ ID NO: 137、SEQ ID NO: 138.

在一些实施方案中, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区选自 SEQ ID NO: 1、9、
45 17、25、33、41、67、75、83、91、99、107 或 115 所示的序列,

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区选自 SEQ ID NO: 49、57、123 或 131 所示的

序列。

在一些实施方案中,所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区选自 SEQ ID NO: 1、9、17、25、33 或 41 所示的序列,

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区选自 SEQ ID NO: 49 或 57 所示的序列。

5 在一些实施方案中,所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区选自 SEQ ID NO: 67、75、83、91、99、107 或 115 所示的序列,

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区选自 SEQ ID NO: 123 或 131 所示的序列。

在一些实施方案中,所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区、轻链可变区选自如下序列组合:

- 10 (1) SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 57;
 (2) SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 49;
 (3) SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 57;
 (4) SEQ ID NO: 115 和 SEQ ID NO: 131。

在一些实施方案中,所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区、轻链可变区的序列分别为 SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 49。

15 在一些实施方案中,所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链恒定区选自人源性 IgG(如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)、IgM、IgA、IgD、IgA 恒定区或上述恒定区的突变体,优选为人源性 IgG1;

20 所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链恒定区选自人源性 lambda 恒定区、kappa 恒定区或上述恒定区的突变体,优选为人源性 kappa 恒定区。

在一些实施方案中,所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO: 65 所示的序列,或者包含与 SEQ ID NO: 65 所示序列的同一性大于 70%,例如大于 75%、80%、85%、90%、95%、99% 的序列;

25 所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO: 66 所示的序列,或者包含与 SEQ ID NO: 66 所示序列的同一性大于 70%,例如大于 75%、80%、85%、90%、95%、99% 的序列。

在一些实施方案中, p 为 3.0-4.0。

在一些实施方案中, p 为 3.0-3.8。

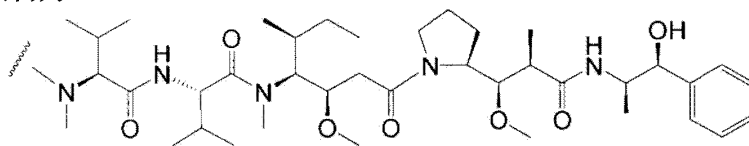
在一些实施方案中, p 为 3.0、3.4、3.5 或 3.8。

30 在一些实施方案中, p 为 3.8。

在一些实施方案中,所述细胞毒剂选自 SN-38、吉西他滨(Gemcitabine)、Monomethyl auristatin E (MMAE)、Monomethyl auristatin F (MMAF)、美登木素生物碱(例如 Maytansine DM1、Maytansine DM4)、卡奇霉素(calicheamicin)、MGBA(如 duocarmycin)、阿霉素(doxorubicin)、蓖麻毒素、白喉毒素等毒素、I131、白介素类、肿瘤坏死因子、趋化因子和纳米颗粒。

35 在一些实施方案中,所述细胞毒剂为 MMAE。

MMAE 的结构为:

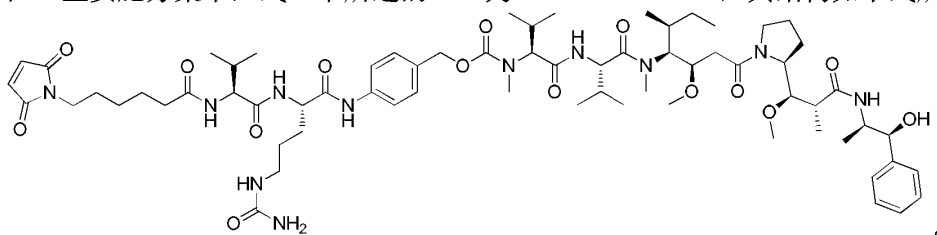


40 在一些实施方案中,所述接头选自 6-马来酰亚氨基己酰基(MC)、马来酰亚氨基丙酰基(MP)、N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)、4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-甲酰基(MCC)、N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)、和 6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-vc-PAB)。

在一些实施方案中,所述接头为 6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧

羰基(MC-vc-PAB)。

在一些实施方案中, 式 I 中所述的 L-D 为 MC-vc-PAB-MMAE, 其结构如下式所示:



在一些实施方案中,

5 Ab 包括:

(a) 重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 和轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3, 其中, 重链可变区 CDR1 的序列如 SEQ ID NO: 42 所示, 重链可变区 CDR2 的序列如 SEQ ID NO: 43 所示, 重链可变区 CDR3 的序列如 SEQ ID NO: 44 所示, 轻链可变区 CDR1 的序列如 SEQ ID NO: 50 所示, 轻链可变区 CDR2 的序列如 SEQ ID NO: 51 所示, 轻链可变区 CDR3 的序列如 SEQ ID NO: 52 所示;

(b) 重链可变区和轻链可变区, 其中, 重链可变区的序列如 SEQ ID NO: 41 所示, 轻链可变区的序列如 SEQ ID NO: 49 所示; 和/或

(c) 重链和轻链, 其中, 重链的序列如 SEQ ID NO: 65 所示, 轻链的序列如 SEQ ID NO: 66 所示;

15 L 为 MC-vc-PAB; 和

D 为 MMAE。

在本发明的第二方面, 本发明提供了组合物, 其包含前述的抗体药物偶联物, 其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物。

在一些实施方案中, 所述组合物中还包含已知的用于治疗肿瘤的化疗药物, 所述化疗药物例如为阿霉素(Adriamycin)、环磷酰胺、紫杉烷类【如紫杉醇(Taxol)、多西他赛(Taxotere)】、卡培他滨(Xeloda)、吉西他滨(Gemzar)、长春瑞滨(Navelbine)、他莫昔芬、芳香酶抑制剂(瑞宁得、弗隆、阿诺新)、5-FU 加亚叶酸、伊立替康(camptosar)、奥沙利铂、顺铂、卡铂、雌莫司汀、米托蒽醌(Novantrone)、泼尼松、长春新碱(Oncovin)、多柔比星、强的松等, 或它们的组合。

25 在一些实施方案中, 所述组合物中还包含已知的用于治疗肿瘤的免疫治疗药物, 所述免疫治疗药物例如为 PD-1 单抗(例如帕博利珠单抗、纳武利尤单抗)、PD-L1 单抗(例如 Atezolizumab)、TIGIT 单抗, 4-1BB 单抗, VEGFR2 单抗(例如 Ramucirumab、阿帕替尼)、HER2 单抗(例如曲妥珠单抗、Trastuzumab biosimilar、Trastuzumab-dkst)等, 或它们的组合。

30 在一些实施方案中, 所述组合物中还包含免疫抑制剂, 所述免疫抑制剂选自: (1) 糖皮质激素类, 如可的松和强的松; (2) 微生物代谢产物, 如环孢菌素和藤霉素等; (3) 抗代谢物, 如硫唑嘌呤和 6-巯基嘌呤等; (4) 多克隆和单克隆抗淋巴细胞抗体, 如抗淋巴细胞球蛋白和 OKT3 等; (5) 烷化剂类, 如环磷酰胺。具体地, 所述免疫抑制剂例如为甲基强的松龙, 强的松, 硫唑嘌呤, 普乐可复, 赛尼哌, 舒莱, 环孢菌素, 他克莫司, 雷帕霉素, 霉酚酸酯, 咪唑立宾, 环磷酰胺, 芬戈莫德等。

35 在一些实施方案中, 所述组合物还包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

在本发明的第三方面, 本发明提供了前述的抗体药物偶联物, 其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物或者前述的组合物在制备药物中的用途, 所述药物用于预防和/或治疗与 Claudin 18.2 相关的疾病。

40 在一些实施方案中, 所述与 Claudin 18.2 相关的疾病为胃癌、胃食管交界腺癌、胰腺腺癌。

在一些实施方案中,所述与 Claudin 18.2 相关的疾病为胃癌。

在本发明的第四方面,本发明提供了预防和/或治疗与 Claudin 18.2 相关的疾病的方法,其包括:给予有需要的受试者预防和/或治疗有效量的前述的抗体药物偶联物,其药

5 学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物,或者前述的组合物。
在一些实施方案中,所述与 Claudin 18.2 相关的疾病为胃癌、胃食管交界腺癌、胰

腺癌。

在一些实施方案中,所述与 Claudin 18.2 相关的疾病为胃癌。

10 在本发明的第五方面,本发明提供了前述的抗体药物偶联物,其药上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物,或者前述的组合物,其用于预防和/或治疗与 Claudin 18.2 相关的疾病。

在一些实施方案中,所述与 Claudin 18.2 相关的疾病为胃癌、胃食管交界腺癌、胰

腺癌。
在一些实施方案中,所述与 Claudin 18.2 相关的疾病为胃癌。

15 附图说明

图 1 是本发明实施例的 RT-PCR 显示 HEK293 稳转细胞株分别表达紧密连接蛋白 18.1 和紧密连接蛋白 18.2; HEK293-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株和对照 KATO III 细胞均可扩增出紧密连接蛋白 18.2 特异性的 780bp 特征条带,而 HEK293-紧密连接蛋白 18.1 只能

20 扩增出 504bp 的共同片段;
图 2 是本发明实施例的 FACS 实验筛选 HEK293-紧密连接蛋白 18.2 高表达稳转细胞株的结果,其中黑色点为阴性对照,灰色点为 HEK293-紧密连接蛋白 18.2 高表达稳转细胞株;

图 3 是本发明实施例的 FACS 实验筛选 NIH3T3-紧密连接蛋白 18.2 高表达稳转细胞株的结果,其中黑色的线为阴性对照,灰色的阴影为 3T3-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株;
25 NO. 32-H 为高表达的 3T3-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株,NO. 18-M 为中表达的 3T3-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株,NO. 6-L 为低表达的 3T3-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株;

图 4 是本发明实施例的 Anti-Claudin18.2 抗体 ADCC 效应结果图;

图 5 是本发明实施例的 Anti-Claudin18.2 抗体 CDC 效应结果图;

图 6 是本发明实施例的抗体药物偶联物疏水作用色谱图 (HIC);

图 7 是本发明实施例的不同 CM311ADC 在 LT-M11 细胞株中的细胞杀伤作用结果图;

30 图 8 是本发明实施例的 CM311-ADC-1 和对照 CM311-ADC-2 对人胃癌裸小鼠 PDX 模型 ST0#025 肿瘤生长抑制活性结果图;

图 9 是本发明实施例的 CM311-ADC-1 和对照 CM311-ADC-2 对人胃癌裸小鼠 PDX 模型 ST0#025 的动物体重的影响结果图;

图 10 是本发明实施例的 CM311-ADC-1 和对照 CM311-ADC-2 对人胃癌裸小鼠 PDX 模型
35 ST0#523 肿瘤生长抑制活性结果图;

图 11 是本发明实施例的 CM311-ADC-1 和对照 CM311-ADC-2 对人胃癌裸小鼠 PDX 模型 ST0#523 的动物体重的影响结果图;

图 12 是本发明实施例的抗体药物偶联物与抗体的体外细胞活性比较结果图 (QC Log 变换独立拟合图)。

40

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
45 以通过市购获得的常规产品。

在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员

所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

5 Claudin 蛋白是构成紧密连接结构的骨架蛋白，位于相邻细胞间隙顶侧，其分布具有组织器官特异性，功能主要为细胞间黏附、维持细胞极性、调节细胞旁通透性及参与细胞增殖、分化的调节。在肿瘤中，细胞间的紧密连接遭到破坏，Claudin 无法发挥其正常功能。

10 Claudin 18 是 Claudin 家族成员，具有 2 种不同的第一个外显子，因此通过选择性剪切可以产生两种亚型：Claudin 18.1 和 Claudin 18.2，这两种亚型分别在不同的组织中进行转录扩增，其中，Claudin 18.1 主要表达在肺组织，而 Claudin 18.2 则特异性表达于胃组织。Claudin 18.2 (GenBank 登录号：NM_001002026.3) 在除了胃黏膜之外的其他正常组织都不表达，但其在多种肿瘤中有显著上调，包括 80% 的胃肠道腺瘤、60% 的胰腺肿瘤，以及部分胆管、卵巢和肺部等的肿瘤中。

15 术语“Claudin 18.2 相关的疾病”指的是组织细胞中 Claudin 18.2 的表达不同于（如超过）正常水平的疾病。例如，某组织细胞中 Claudin 18.2 的表达水平高于参照或对照（即正常组织细胞）中 Claudin 18.2 的表达水平，则指示所述组织细胞所来源的对象（特别是人）中 Claudin 18.2 相关疾病的存在。

在本发明中，除非另有说明，否则任何数值范围应理解为包括范围内的任何值或任何子范围。

20 在本发明中，术语“抗体”是指通常由两对相同的多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体的轻链可分为 κ 和 λ 两类。重链可分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ 五种，依据重链的不同可将抗体分为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE 五类。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（V_H）和重链恒定区（C_H）组成。重链恒定区由 3 个结构域（C_H1、C_H2 和 C_H3）组成。各轻链由轻链可变区（V_L）和轻链恒定区（C_L）组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区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）和补体系统的组分 C1q 的结合。V_H 和 V_L 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骨架区（FR）的区域。各 V_H 和 V_L 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（V_H 和 V_L）分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 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 的定义。

35 在本发明中，用于确定序列同一性（同源性）和序列相似性百分数的算法是例如 BLAST 和 BLAST 2.0 算法，它们分别描述在 Altschul 等 (1977) Nucl. Acid. Res. 25: 3389-3402 和 Altschul 等 (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410。采用例如文献中所述或者默认参数，BLAST 和 BLAST 2.0 可以用于确定本发明的氨基酸序列同一性百分数。执行 BLAST 分析的软件可以通过国立生物技术信息中心为公众所获得。

40 在本发明中，所述与氨基酸序列具有至少 70% 的序列同一性的氨基酸序列包括与所述氨基酸序列基本同一的多肽序列，例如当采用本文所述方法（例如采用标准参数的 BLAST 分析）时，与本发明多肽序列相比含有至少 70% 序列同一性、优选至少 75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高的序列同一性的那些序列。

45 在本发明中，所述氨基酸序列的突变体指的是与所述氨基酸序列的同一性大于 70%，例如大于 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列，

例如具有 3 个、2 个或 1 个取代、缺失或添加氨基酸的序列。优选的是，取代、添加或缺失的氨基酸不超过 3 个氨基酸。更优选的是，取代、添加或缺失的氨基酸不超过 2 个氨基酸。最优选的是，取代、添加或缺失的氨基酸不超过 1 个氨基酸。

“取代型”变体是天然序列中至少一个氨基酸残基被除去并被不同的氨基酸插入其相同位置的变体。所述取代可为单个的，其中该分子中仅有一个氨基酸被取代；或可为多个的，其中该相同分子有两个或更多的氨基酸被取代。多个取代可位于连续的位点。同样，一个氨基酸可被多个残基取代，其中这样的变体包括取代和插入二者。“插入型”（或“添加型”）变体是一个或多个氨基酸被插入到紧邻一段天然序列某个特定位置处的氨基酸的变体。紧邻氨基酸意指与该氨基酸的 α -羧基或 α -氨基官能团连接。“缺失型”变体是天然氨基酸序列中一个或多个氨基酸被除去的变体。通常情况下，缺失型变体在其分子的特定区域内有一个或两个氨基酸被缺失。

在某些实施方案中，在偶联反应中少于理论最大值的药物模块偶联至抗体。一般而言，抗体不包含许多游离的和反应性的半胱氨酸硫醇基，其可连接药物模块；事实上，抗体中的大多数半胱氨酸硫醇基以二硫桥形式存在。在某些实施方案中，可以在部分或完全还原性条件下用还原剂诸如二硫苏糖醇 (DTT) 或三羰基乙基膦 (TCEP) 还原抗体以产生反应性半胱氨酸硫醇基。

在一些实施方案中，所述药学上可接受的盐为无机酸盐或有机酸盐，其中，所述无机酸盐为盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐和碳酸盐、硫酸盐或磷酸盐，所述有机酸盐为甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、苯甲酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐、 α -甘油磷酸盐、烷基磺酸盐或芳基磺酸盐；优选地，所述烷基磺酸盐为甲基磺酸盐或乙基磺酸盐；所述芳基磺酸盐为苯磺酸盐或对甲苯磺酸盐。

药学上可以接受的盐可使用本领域熟知的标准程序获得，例如，通过将足量的碱性化合物和提供药学上可以接受的阴离子的合适的酸反应。

如本文所使用，除非另外说明，术语“前药”是指可以在生物学条件（体外或体内）下水解、氧化或进行其他反应以提供本发明的化合物的衍生物。前药仅在生物学条件下经过该反应成为活性化合物，或者它们在它们不反应的形式中具有活性。通常可以使用公知的方法制备前药，例如 Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff 编，第 5 版) 中描述的那些方法。

在本发明中，溶剂合物表示这些形式的本发明的抗体药物偶联物：所述抗体药物偶联物通过与溶剂分子配位而形成的固态或液态形式的复合物。水合物是溶剂合物的一种具体形式，其具有配位的水分子。在本发明中，水合物是优选的溶剂合物。

制备各种含有一定量的活性成分的药物组合物的方法是已知的，或根据本发明的公开内容对于本领域技术人员是显而易见的。如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19th ed. (1995) 所述，制备所述药物组合物的方法包括掺入适当的药学赋形剂、载体、稀释剂等，它们在所采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。

本发明的药物组合物可以包含 pH 缓冲水溶液。或者包含，缓冲剂，诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸；低分子量（少于约 10 个残基）多肽；蛋白质，诸如血清蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖，蔗糖，海藻糖或糊精；螯合剂，诸如 EDTA；糖醇，诸如甘露醇或山梨醇；成盐反荷离子，诸如钠；和/或非离子表面活性剂，诸如 TWEEN™、聚乙二醇 (PEG) 和 PLURONICS™。

以已知的方法制造本发明的药物制剂，包括常规的混合、溶解或冻干方法。本发明的化合物可以制成药组合物，并向患者以适于选定的施用方式的各种途径施用，例如，口

服或肠胃外（通过静脉内、肌内、局部或皮下途径）。

因此，本发明的化合物结合药理学上可以接受的载体（如惰性稀释剂或可同化的可食用的载体）可以全身施用，例如，口服。它们可以封闭在硬或软壳的明胶胶囊中，可以压为片剂。对于口服治疗施用，活性化合物可以结合一种或多种赋形剂，并以可吞咽的片剂、
5 颊含片剂、含片、胶囊剂、酏剂、悬浮剂、糖浆、圆片等的形式使用。这种组合物和制剂应该包含至少 0.1% 的活性化合物。这种组合物和制剂的比例当然可以变化，可以占给定的单位剂型重量的大约 1% 至大约 99%。在这种治疗有用的组合物中，活性化合物的量使得能够获得有效剂量水平。

片剂、含片、丸剂、胶囊剂等也可以包含：粘合剂，如黄耆胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶；赋形剂，如磷酸氢二钙；崩解剂，如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸等；润滑剂，如硬脂酸镁；和甜味剂，如蔗糖、果糖、乳糖或阿司帕坦；或调味剂，如薄荷、冬青油或樱桃香味。当单位剂型是胶囊时，除了上面类型的材料，它还可以包含液体载体，如植物油或聚乙二醇。各种其他材料可以存在，作为包衣，或以其他方式改变固体单位剂型的物理形式。例如，片剂、丸剂或胶囊剂可以用明胶、蜡、虫胶或糖等包衣。糖浆或酏剂可以
15 包含活性化合物，蔗糖或果糖作为甜味剂，对羟苯甲酸甲酯或对羟苯甲酸丙酯作为防腐剂，染料和调味剂（如樱桃香料或桔子香料）。当然，用于制备任何单位剂型的任何材料应该是药理学上可以接受的且以应用的量基本上无毒。此外，活性化合物可以掺入缓释制剂和缓释装置中。

活性化合物也可以通过输注或注射来静脉内或腹膜内施用。可以制备活性化合物或其盐的水溶液，任选地混和无毒的表面活性剂。也可以制备在甘油、液体聚乙二醇、甘油三乙酸酯及其混合物以及油中的分散剂。在普通的储存和使用条件下，这些制剂包含防腐剂以防止微生物生长。
20

适于注射或输注的药物剂型可以包括包含适于无菌的可注射或可输注的溶液或分散剂的即时制剂的活性成分（任选封装在脂质体中）的无菌水溶液或分散剂或无菌粉末。在所有情况下，最终的剂型在生产和储存条件下必须是无菌的、液体的和稳定的。液体载体可以是溶剂或液体分散介质，包括，例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等）、植物油、无毒的甘油酯及其合适的混合物。可以维持合适的流动性，例如，通过脂质体的形成，通过在分散剂的情况下维持所需的粒子大小，或通过表面活性剂的使用。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂（如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等）产生预防微生物的作用。在许多情况下，优选包括等渗剂，如糖、缓冲剂或氯化钠。
25 30 通过使用延缓吸收剂的组合物（例如，单硬脂酸铝和明胶）可以产生可注射的组合物的延长吸收。

通过将合适的溶剂中的需要量的活性化合物与需要的上面列举的各种其他成分结合，然后进行过滤灭菌，制备无菌可注射溶液。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下，
35 优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，这会产生活性成分加上任何另外需要的以前无菌过滤溶液中存在的成分的粉末。

有用的固体载体包括粉碎的固体（如滑石、粘土、微晶纤维素、二氧化硅、氧化铝等）。有用的液体载体包括水、乙醇或乙二醇或水-乙醇/乙二醇混合物，本发明的化合物可以任
40 选在无毒的表面活性剂的帮助下以有效含量溶解或分散在其中。可以加入佐剂（如香味）和另外的抗微生物剂来优化对于给定用途的性质。

增稠剂（如合成的聚合物、脂肪酸、脂肪酸盐和酯、脂肪醇、改性纤维素或改性无机材料）也可和液体载体用于形成可涂覆的糊剂、凝胶、软膏、肥皂等，直接用于使用者的皮肤上。

上述制剂可以以单位剂型存在，该单位剂型是含有单位剂量的物理分散单元，适于向
45 人体和其它哺乳动物体给药。单位剂型可以是胶囊或片剂，或是很多胶囊或片剂。根据所涉及的具体治疗，活性成分的单位剂量的量可以在大约 0.1 到大约 1000 毫克或更多之间

进行变化或调整。

此外，还包括各种药物新剂型如乳脂质体、微球和纳米球的应用，如使用微粒分散体系包括聚合物胶束 (polymeric micelles)、纳米乳 (nanoemulsion)、亚微乳

(submicroemuls 微囊 (microcapsule)、微球 (microsphere)、脂质体 (liposomes)

5 和 类脂囊泡 (niosomes) (又称非离子表面活性剂囊泡) 等制备的药剂。

本文使用的术语“治疗”一般是指获得需要的药理和/或生理效应。该效应根据完全或部分地预防疾病或其症状，可以是预防性的；和/或根据部分或完全稳定或治愈疾病和/或由于疾病产生的副作用，可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖了对患者疾病的任何治疗，包括：(a) 预防易感染疾病或症状但还没诊断出患病的患者所发生的疾病或症状；

10 (b) 抑制疾病的症状，即阻止其发展；或 (c) 缓解疾病的症状，即，导致疾病或症状退化。

在本发明中，“受试者”指脊椎动物。在某些实施方案中，脊椎动物指哺乳动物。哺乳动物包括，但不限于，牲畜 (诸如牛)、宠物 (诸如猫、犬、和马)、灵长类动物、小鼠和大鼠。在某些实施方案中，哺乳动物指人。

在本发明中，“有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的治疗或预防效果的量。本发明的物质/分子的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及该物质/分子在个体中引发期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量还涵盖该物质/分子的治疗有益效果胜过任何有毒或有害后果的量。“预防有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的预防效果的量。通常而非必然，由于预防剂量是在疾病发作之前或在疾病的早期用于受试者的，因此预防有效量会低于治疗有效量。在癌症的情况中，药物的治疗有效量可减少癌细胞数；缩小肿瘤体积；抑制 (即一定程度的减缓，优选停止) 癌细胞浸润到周围器官中；抑制 (即一定程度的减缓，优选停止) 肿瘤转移；一定程度的抑制肿瘤生长；和/或一定程度的减轻与癌症有关的一种或多种症状。

在本发明中，20 种常规氨基酸和其缩写遵从常规用法。参见 Immunology-A Synthesis (第 2 版, E. S. Golub 和 D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), 其通过引用合并入本文。

术语“嵌合抗体”是指这样的抗体，其中可变区序列源自一个物种，恒定区序列源自另一物种，如其中可变区序列源自小鼠抗体及恒定区序列源自人抗体的抗体。

“人源化”抗体是指非人 (例如小鼠) 抗体形式，其是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或者其片段 (如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或者抗体的其它抗原结合亚序列)，含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。优选地，人源化抗体是人免疫球蛋白 (接受者抗体)，其中接受者抗体的互补决定区 (CDR) 的残基由来自具有希望的特异性、亲和性和能力的非人物种 (供体抗体) 如小鼠、大鼠或者兔的 CDR 残基置换。

此外，在人源化中，还可能对 VH 和/或 VL 的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 区内的氨基酸残基进行突变，由此改善抗体的一或多种结合特性 (例如亲和性)。可进行例如 PCR 介导的突变引入突变，其对抗体结合或其它功能特性的影响可利用本文所述的体外或体内测试评估。通常，引入保守性突变。此类突变可为氨基酸取代、添加或缺失。另外，CDR 内的突变通常不超过一个或两个。因此，本发明所述人源化抗体还涵盖 CDR 内包含 1 或 2 两个氨基酸突变的抗体。

40 下面结合具体实施例对本发明进行进一步的解释说明，但这些实施例并非限制本发明的范围。

实施例 1 人源化抗体的制备

1、抗紧密连接蛋白 18.2 单克隆抗体的制备

多种策略同时应用于免疫 Balb/c 小鼠和筛选，以获得特异性只结合紧密连接蛋白

45 18.2，不结合紧密连接蛋白 18 不同剪接体紧密连接蛋白 18.1 的单克隆抗体，具体如下：

1) 构建紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株

- 合成含人紧密连接蛋白 18.1 (UniProtKB-P56856) 全长序列的质粒基因紧密连接蛋白 18.1-puc57-Amp (苏州泓迅生物, SynbioTech)。以该质粒为模板, 上游引物 5'-ttggcaaagaattgctagatgtccaccaccacatgcc-3' (SEQ ID NO: 171), 下游引物 5'-tgttcgggccctcctcgattacacatagtcgtgcttg-3' (SEQ ID NO: 172), PCR 扩增人紧密连接蛋白 18.1 全长片段 (Met1-Val261)。扩增产物经 NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB, Cat: M0530L) 酶连后, 克隆到真核表达质粒系统。以此类似, 合成含人紧密连接蛋白 18.2 (UniProtKB-P56856-2) 全长序列的质粒基因紧密连接蛋白 18.2-puc57-Amp (苏州泓迅生物, SynbioTech)。以该质粒为模板, 上游引物 5'-ttggcaaagaattgctagatggccgtgactgcctgtc-3' (SEQ ID NO: 173), 下游引物 5'-tgttcgggccctcctcgattacacatagtcgtgcttg-3' (SEQ ID NO: 174), PCR 扩增人紧密连接蛋白 18.2 全长片段 (Met1-Val261)。扩增产物经 NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB, Cat: M0530L) 酶连后, 克隆到真核表达质粒系统。以此质粒分别电转 NIH3T3 和 HEK293 细胞, 使用 1-10 μ g/mL Puromycin (Gibco, Cat: A1113803) 进行逐步加压筛选稳定表达细胞系。
- 得到的 HEK293-紧密连接蛋白 18.1 和 HEK293-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞系首先用 RT-PCR 方法进行验证。用 Trizol RNA 提取试剂盒从阳性克隆细胞中提取总 RNA, 用逆转录试剂盒 (SuperScriptTM First-Strand Synthesis System, Cat: 18080051), 利用 Oligo(dT) 引物逆转录得到 cDNA 文库。由于紧密连接蛋白的 2 个剪接片段紧密连接蛋白 18.1 和紧密连接蛋白 18.2 区别在于氮端到第一个胞外区 (Loop1), 设计引物 KNB14 (5'-tgtgcgccaccatggccgtg-3' (SEQ ID NO: 175)), KNB15 (5'-tgtgaaggataagattgtacc-3' (SEQ ID NO: 176)), 可以扩增紧密连接蛋白 18.1 和紧密连接蛋白 18.2 的 Loop1 之后到碳端之间区域 (504bp); 设计引物 KNB16 (5'-tgggtgccattggcctcctg-3' (SEQ ID NO: 177)), 特异性互补结合紧密连接蛋白 18.2 氮端, 不结合紧密连接蛋白 18.1 氮端区域, 只扩增紧密连接蛋白 18.2 的氮端到碳端之间全长片段 (780bp), 以表达紧密连接蛋白 18.2 的 KATO III 细胞 (ATCC HTB-103) 作为阳性对照。结果见图 1, RT-PCR 显示 HEK293 稳转细胞株分别表达紧密连接蛋白 18.1 和紧密连接蛋白 18.2。HEK293-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株和对照 KATO III 细胞均可扩增出紧密连接蛋白 18.2 特异性的 780bp 特征条带, 而 HEK293-紧密连接蛋白 18.1 只能扩增出 504bp 的共同片段。
- 将构建的稳转细胞株 HEK293-紧密连接蛋白 18.2 细胞和 NIH3T3-紧密连接蛋白 18.2 细胞消化收集, PBS 洗 2 次, 每管加入 100 μ L 1:200 稀释的一抗兔抗紧密连接蛋白 18.2 (Abcam, EPR19202, 货号: ab222512), 4 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟, 用 0.5% BSA/PBS 洗去多余的一抗溶液, 再加入 50 μ L 二抗山羊抗兔 IgG Fc-AF647 (Jackson ImmunoResearch, 货号: 111-606-046), 4 $^{\circ}$ C 孵育 45 分钟, 之后用 0.5% BSA/PBS 洗去多余的二抗, 最后用 100 μ L PBS 溶液重悬细胞, 立即上流式细胞仪检测。结果见图 2、图 3。
- 图 2 显示了通过 FACS 实验, 检测转染紧密连接蛋白 18.2 全长基因的 HEK293-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株的结果。其中黑色点为未转染的 HEK293 细胞, 灰色点为 HEK293-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株, HEK293 细胞不表达紧密连接蛋白 18.2, HEK293-紧密连接蛋白 18.2 稳转株在细胞膜表面高表达紧密连接蛋白 18.2。
- 图 3 显示了通过 FACS 实验, 检测紧密连接蛋白 18.2 在 NIH3T3-紧密连接蛋白 18.2 高表达稳转细胞株的结果。其中黑色的线为阴性对照, 灰色的阴影为 3T3-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株。NO. 32-H 为紧密连接蛋白 18.2 高表达的 3T3-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株, NO. 18-M 为紧密连接蛋白 18.2 中表达的 3T3-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株, NO. 6-L 为紧密连接蛋白 18.2 低表达的 3T3-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株。
- 将扩增生长的阳性稳转细胞系收集冻存, 其中 NIH3T3-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞株用于免疫动物。

2) 从杂交瘤制备抗紧密连接蛋白 18.2 单克隆抗体

取 6~8 周雌性 Balb/c 小鼠,以 3T3-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞或编码紧密连接蛋白 18.2 的质粒分别进行免疫,或交替进行免疫。用细胞进行免疫时,每次取 1×10^6 3T3-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞与弗氏佐剂或非弗氏佐剂混合后,注射大腿根部和足垫,两周后在不同部位再次免疫。采用 DNA 进行免疫时,取 20 μ g 质粒与 1 μ g CpG 混合后,用基因枪 (Biorad) 40psi 直接打入小鼠腹部,每周免疫一次。准备融合前 3 天,采用 HEK293-紧密连接蛋白 18.2 高表达的稳转细胞株 1×10^6 细胞/50 μ L/只,进行尾静脉注射冲击免疫。三天后处死小鼠,收集淋巴结、腹股沟淋巴结、髂淋巴结,在 DMEM 中研磨得到富含 B 细胞的悬浮液;取出小鼠脾脏,在 DMEM 中研磨后离心,得到脾细胞悬浮液。取适量的淋巴结和脾细胞的混悬液和 SP2/0 混合后,采用电融合法进行细胞融合。

3) 构建抗紧密连接蛋白 18.2 噬菌体抗体库

将收集的部分小鼠脾脏与外周淋巴结细胞悬液,用 Trizol RNA 提取试剂盒提取总 RNA,用逆转录试剂盒 (SuperScript First-Strand Synthesis System, 货号 18080051),利用轻、重链特异性引物逆转录分别得到抗体轻、重链 cDNA 文库。以该 cDNA 为模板,利用轻、重链可变区引物 PCR 扩增抗体轻、重链可变区片段,酶切克隆到含有人抗体轻链恒定区 Ckappa 或人 IgG1 重链恒定区 CH1 的噬菌体质粒载体,分别形成嵌合体轻链库和重链库。将轻链库中的抗体片段以 BspQI 和 SfiI 双酶切后,连接进入重链库,形成基于丝状噬菌体 M13 的小鼠嵌合体 Fab 噬菌体展示文库,库容为 1.2×10^{10} 。取 0.8mL 噬菌体 (滴度约 1×10^{13} /mL) 与 200 μ L 5%BSA/PBS 混合后,加入 1×10^7 HEK293-紧密连接蛋白 18.1 细胞,冰浴 1 小时;1000rpm 离心 10 分钟,收集上清,将上清与 1×10^6 HEK293-紧密连接蛋白 18.2 细胞混合,冰浴 1 小时,1000rpm 离心 3 分钟,弃上清;加入 1 mL 1% BSA/PBS,反复洗涤 5-10 次;加入 1 mL 100mM TEA (三乙胺)裂解细胞,室温 10 分钟,加入 0.5 mL 1M Tris-HCl, pH7.5 中和后,感染 10 mL 处于对数生长期的 TG1 *E. coli* 细胞,37 $^{\circ}$ C 静置 30 分钟。按照分子生物学常规流程,回收噬菌体,检测滴度并进行下一轮筛选。

2、抗紧密连接蛋白 18.2 特异性抗体的筛选和序列获取

将 HEK293-紧密连接蛋白 18.1、HEK293-紧密连接蛋白 18.2 和 HEK293 分别以 5 μ M、0.5 μ M 和 0 μ M Cell Tracker Green CMFDA Dye (Thermo, 货号 C2925) 按说明进行活细胞预染,洗去染料后,按 1:1:1 混合,加至 96 孔板 (2×10^5 细胞/孔),并与杂交瘤上清或细菌诱导上清结合,冰浴孵育 1 小时后,加入 AlexaFluro647 标记的二抗抗 mouse IgG Fc 或抗人 IgG F(ab)'₂ (Jackson ImmunoResearch),冰上孵育 45 分钟。洗涤后,每孔加入 100 μ L PBS 重悬细胞,准备流式细胞仪 (iQue Screener),根据 FL2 通道荧光强度区别,分别圈出三种不同的细胞群后,检测 FL4 通道待测抗体与各细胞群的结合情况。筛选得到的抗体以高亲和力、特异性结合 HEK293-紧密连接蛋白 18.2 稳转细胞,同时不结合 HEK293-紧密连接蛋白 18.1 稳转细胞及 HEK293 细胞。从杂交瘤细胞中,通过 FACS 检测,共筛选出 320 个克隆可以结合紧密连接蛋白 18.2,同时不结合紧密连接蛋白 18.1;经过 3 轮 panning,从噬菌体 Fab 库中,筛选得到 62 个高亲和力结合紧密连接蛋白 18.2 但不结合紧密连接蛋白 18.1 的克隆。

从噬菌体库筛选得到的阳性克隆,提取质粒进行测序,可变区序列分别克隆进入重链和轻链恒定区载体进行全长 IgG 表达。从杂交瘤得到的阳性细胞中,加入 1mL TRNzol 进行裂解,以异硫氰酸胍法提取总 RNA。以此为模板,合成第一链 cDNA 后,以第一链 cDNA 为后续模板扩增杂交瘤细胞所对应的可变区 DNA 序列。将扩增产物测序后,得到候选杂交瘤重链和轻链可变区序列,如下所示。

克隆 18D10:

重链

DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSNYAWNWRQFPGNKLEWMGYINYSGNTNYPNLSKRSRISITRD
TSKNQFFLQLNSVTAEDTATYYCATSYGNSFIYWGQGTILVTVSA (SEQ ID NO: 139)。

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 140)、CDR2 (SEQ ID NO: 141)、CDR3 (SEQ ID NO: 142)；

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 143)、FR2 (SEQ ID NO: 144)、FR3 (SEQ ID NO: 145)、FR4 (SEQ ID NO: 146)。

5 核酸序列

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCA
CTGGCTACTCAATCACCAGTAATTATGCCTGGAACCTGGATCCGACAGTTCCAGGAAACAACTAGAGTGGATGGGC
TACATAAACTACAGTGGGAACATACTATAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAA
GAACCAGTTCTTCTGCACTTGAATTCTGTGACTGCTGAGGACACAGCCACATATTATTGTGCAACCTCCTATTATG
10 GTAATTCCTTTATTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 178)。

轻链

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGS
GTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNAVSPFWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 147)。

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 148)、CDR2 (SEQ ID NO: 149)、CDR3 (SEQ ID NO: 150)；

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 151)、FR2 (SEQ ID NO: 152)、FR3 (SEQ ID NO: 153)、FR4 (SEQ ID NO: 154)。

核酸序列

GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGACAGCAGGAGAGAAGGTCCTATGAGCTGCAAGT
20 CCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAGTCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGA
TTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGAGAATGCTTATAGTTTCCGT
GGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAA (SEQ ID NO: 179)。

克隆 18A9:

25 重链

QVQLQQSGREVVRPGTSVKVSKPSGYAFTNYLIDWVKQRPQGGLWIGGINPGSGDVTYNEKFKAKATLTAD
KSSMTANMQLSSLTSDDSAVYFCARRVRGNSFDSWGQGTILVTVSA (SEQ ID NO: 155)。

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 156)、CDR2 (SEQ ID NO: 157)、CDR3 (SEQ ID NO: 158)；

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 159)、FR2 (SEQ ID NO: 160)、FR3 (SEQ ID NO: 161)、FR4 (SEQ ID NO: 162)。

核酸序列

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGACGTGAGGTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTT
CTGGATACGCCTTCACTAATTACTTGATAGACTGGGTAAGGAGGCTGGACAGGCGCTTGAGTGGATTGGAGGG
35 ATTAATCCTGGAAGTGGTGACACTGTGTACAATGAGAAGTTCAAGGCCAAGGCAACACTGACTGCAGACAAATCCTC
CATGACTGCCAACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTATTCTGCGCAAGAAGGGTCCGTG
GTAATTCGTTTGATTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 180)。

轻链

DIVMSQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGS
40 GKDFLTITSSVQAEDLALYYCQNNFYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 163)。

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 164)、CDR2 (SEQ ID NO: 165)、CDR3 (SEQ ID NO: 166)；

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 167)、FR2 (SEQ ID NO: 168)、FR3 (SEQ ID NO: 169)、FR4 (SEQ ID NO: 170)。

45 核酸序列

GACATTGTGATGTACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGACAGCAGGAGAGAAGGTCCTATGAGCTGCAAGT

CCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAAATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
AAATTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAAAAGA
TTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCACTTTATTACTGTCAGAATAATTATTTTATCCGC
TCACGTTCCGGTGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 181)。

5 上述重链和轻链可变区序列片段 PCR 扩增, 将重链可变区克隆入含有人重链恒定区的
载体, 以在哺乳动物细胞中表达完整的 IgG1 重链。类似地, 将轻链可变区克隆入含有人
轻链恒定区的载体, 以在哺乳动物细胞中表达完整的 kappa 轻链。经测序正确后转染入
HEK293-6E 哺乳动物细胞中, IgG1 经表达分泌入培养基中, 合并收集上清, 过滤后纯化。
10 Tris-HCl pH8.0, 250mM NaCl 洗涤, 用 0.1M Glycine-HCl, pH3.0 将结合的 IgG 洗脱下
来。利用浓缩管 (Millipore) 将蛋白超滤浓缩, 检测 OD280, 通过分光光度法测定 IgG
的浓度。采用 SDS-PAGE 分析 IgG 的纯度。

取对数生长期的 HEK293-紧密连接蛋白 18.1 细胞、HEK293-紧密连接蛋白 18.2 细胞和
HEK293 细胞, 消化后以 5×10^4 细胞/100 μ L 加入 U 型 96 孔板, 1100 rpm 离心 3 分钟, 弃
15 上清, 轻轻拍散细胞, 每孔加入 50 μ L 梯度稀释的抗体 (抗体浓度从 100nM 起, 5 倍稀释 8
个梯度), 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。孵育结束后, 每孔加入 140 μ L 0.5%BSA 洗 3 次, 加 30 μ L /孔
二抗 AlexaFluro647 抗人 IgG (Jackson ImmunoResearch, 货号: 109-606-170), 4 $^{\circ}$ C
孵育 40 分钟。孵育结束后, 每孔加入 140 μ L 0.5%BSA 洗 3 次, 最后每孔重悬于 50 μ L PBS
20 进行流式细胞仪 (iQue Screener) 检测。结果如表 1 所示, 结果显示, 得到的嵌合体紧
密连接蛋白 18.2 IgG1 抗体只识别转染了紧密连接蛋白 18.2 的 HEK293-紧密连接蛋白 18.2
细胞, 但与 HEK293 和 HEK293-紧密连接蛋白 18.1 无结合。

表 1: 紧密连接蛋白 18.2 抗体与稳转细胞株的结合 (N. B. 表示未检测到结合)

mAb	紧密连接蛋白 18.2	紧密连接蛋白 18.1	HEK293
	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)
克隆 18D10	0.37	N. B.	N. B.
克隆 18A9	0.31	N. B.	N. B.

3、抗紧密连接蛋白 18.2 抗体的人源化

25 把选择的单克隆抗体可变区序列与人胚系抗体序列进行比对, 找出同源性高的序列进
行 CDR 移植; 随后同时利用计算机进行同源建模, 分析 CDR 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, 分析各阳性单
克隆抗体基因序列中可能与靶点相互作用以及维护空间构架的关键氨基酸个体, 在此基础
30 上设计回复突变位点。分析考察 HLA-DR 亲和性, 选出免疫原性较低的人胚胎系框架序列。
分析可能在发酵过程中发生修饰的氨基酸残基, 并设计突变以降低发生修饰的可能性。

设计共得到不同的重链衍生物和轻链衍生物, 将轻、重链衍生物分别进行全序列合成
后, 克隆到含有抗体 kappa 链恒定区 Ckappa 或人 IgG1 恒定区 CH1-CH3 的载体, 同样母本
来源的轻、重链衍生物质粒进行组合配对后, 转染 HEK293.6E 细胞, 表达 5-6 天, 收取上
清 Protein A 柱纯化。

35 人源化抗体的序列如下:

18D10:

重链可变区:

18D10VHv1:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYAWNWRQPPGKGLEWIGYINYSNTNYPNPSLKSRTISR

40 TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATSYYGNSFIYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)。

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 2)、CDR2 (SEQ ID NO: 3)、
CDR3 (SEQ ID NO: 4) ;

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 5)、FR2 (SEQ ID NO: 6)、FR3 (SEQ ID NO: 7)、FR4 (SEQ ID NO: 8)。

核酸序列

5 CAGGTT CAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGT
CCGGCTACAGCATCACCAGCAACTACGCCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGC
TACATCAACTACAGCGGCAACACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCAGAGACACCAGCAA
GAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTACTACG
GCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 182)。

18D10VHv2:

10 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSNYAWNWRQPPGKGLEWMGYINYSNTNYPNPSLKSRITISRD
TSKNQFSLKLSSVTAADTAIVYYCATSYYGNSFIYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO: 9)。

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 10)、CDR2 (SEQ ID NO: 11)、
CDR3 (SEQ ID NO: 12)；

15 无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 13)、FR2 (SEQ ID NO: 14)、
FR3 (SEQ ID NO: 15)、FR4 (SEQ ID NO: 16)。

核酸序列

20 CAGGTT CAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGT
CCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACGCCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATGGGC
TACATCAACTACAGCGGCAACACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAATCACCATCAGCAGAGACACCAGCAA
GAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTACTACG
GCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 183)。

18D10VHv3:

25 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSNYAWNWRQPPGKLEWIGYINYSNTNYPNPSLKSRVTISRD
TSKNQFSLKLSSVTAADTAIVYYCATSYYGNSFIYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO: 17)。

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 18)、CDR2 (SEQ ID NO: 19)、
CDR3 (SEQ ID NO: 20)；

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 21)、FR2 (SEQ ID NO: 22)、
FR3 (SEQ ID NO: 23)、FR4 (SEQ ID NO: 24)。

核酸序列

30 CAGGTT CAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGT
CCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACGCCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGC
TACATCAACTACAGCGGCAACACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCAGAGACACCAGCAA
GAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTACTACG
GCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 184)。

35 18D10VHv4:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSNYAWNWRQPPGKLEWIGYINYSNTNYPNPSLKSRVTISRD
TSKNQFSLKLSSVTAADTAIVYYCATSYYGNSFIYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO: 25)。

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 26)、CDR2 (SEQ ID NO: 27)、
CDR3 (SEQ ID NO: 28)；

40 无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 29)、FR2 (SEQ ID NO: 30)、
FR3 (SEQ ID NO: 31)、FR4 (SEQ ID NO: 32)。

核酸序列

45 CAGGTT CAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGT
CCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACGCCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGC
TACATCAACTACAGCGGCTACACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCAGAGACACCAGCAA
GAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTACTACG

GCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 185)。

18D10VHv5:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSNYAWNWRQPPGKLEWIGYINYSNTAYNPSLKSRVTISRDT
TSKNQFSLKLSSVTAADTAIVYYCATSYYGNSFIYWGGQTLVTVSS (SEQ ID NO: 33)。

- 5 其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 34)、CDR2 (SEQ ID NO: 35)、
CDR3 (SEQ ID NO: 36)；

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 37)、FR2 (SEQ ID NO: 38)、
FR3 (SEQ ID NO: 39)、FR4 (SEQ ID NO: 40)。

核酸序列

- 10 CAGGTTCACTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGT
CCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACGCCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGC
TACATCAACTACAGCGGCAACACCGCCTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCAGAGACACCAGCAA
GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTACTACG
GCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 186)。

- 15 18D10VHv6:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSNYAWNWRQPPGKLEWIGYIYSGNTNYPNPSLKSRVTISRDT
TSKNQFSLKLSSVTAADTAIVYYCATSYYGNSFIYWGGQTLVTVSS (SEQ ID NO: 41)。

- 20 其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 42)、CDR2 (SEQ ID NO: 43)、
CDR3 (SEQ ID NO: 44)；

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 45)、FR2 (SEQ ID NO: 46)、
FR3 (SEQ ID NO: 47)、FR4 (SEQ ID NO: 48)。

核酸序列

- 25 CAGGTTCACTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGT
CCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACGCCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGC
TACATCTACTACAGCGGCAACACCACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCAGAGACACCAGCAA
GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTACTACG
GCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 187)。

轻链可变区:

18D10VLv1:

- 30 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS
GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQAYSPFWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 49)。

- 其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 50)、CDR2 (SEQ ID NO: 51)、
CDR3 (SEQ ID NO: 52)；

- 35 无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 53)、FR2 (SEQ ID NO: 54)、
FR3 (SEQ ID NO: 55)、FR4 (SEQ ID NO: 56)。

核酸序列

- 40 GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGA
GCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCT
AAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGCGTGCCAGATAGATTACGCGCAGCGGCTCTGGAACCGA
CTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGTGAGAACGCCTACAGCTTCCCCCT
GGACATTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAG (SEQ ID NO: 188)。

18D10VLv2:

- 45 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS
GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQAYSPFWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 57)。

- 其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 58)、CDR2 (SEQ ID NO: 59)、
CDR3 (SEQ ID NO: 60)；

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 61)、FR2 (SEQ ID NO: 62)、FR3 (SEQ ID NO: 63)、FR4 (SEQ ID NO: 64)。

核酸序列

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGA
5 GCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCT
AAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCAGATAGATTAGCGGCAGCGGCTCTGGAACCGA
CTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGTCAGCAGGCCTACAGCTTCCCCT
GGACATTGGCCAGGCCACCAAGGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO: 189)。

优选的人源化抗体的序列如下：

10 重链氨基酸序列：

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSNYAWNWRQPPGKLEWIGYIYYSGNTNYPNPSLKSRTVISRD
TSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCATSYGNSFIYWGGTLVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTC
PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
15 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
65)。

重链核酸序列

CAGGTTCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGT
20 CCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACGCTGGAAGTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGC
TACATCTACTACAGCGGCAACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCAGAGACACCAGCAA
GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTACTACG
GCAACAGCTTCATCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCAACCGTTTCTCTGCTAGCACCAGGGCCCATCCGTCTTC
CCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
25 ACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAG
GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTG
CCCAGCACCTGAAGTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
30 GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT
CACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCA
TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACAGGTGACGCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCA
35 AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
CACTACACGAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 190)。

轻链氨基酸序列：

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS
GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNAYSFPWTFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA
40 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 66)。

轻链核酸序列

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGA
GCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCT
45 AAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCAGATAGATTAGCGGCAGCGGCTCTGGAACCGA
CTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGTCAGAACGCCTACAGCTTCCCCT

GGACATTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA
GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT
5 CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 191)。

18A9:

重链可变区:

18A9VHv1:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKPSGYAFTNYLIDWVRQAPGQGLEWMGGINPGSGDTVYNEKFQGRVTLTAD
10 KSSMTAYMELSSLRSEDVAVYFCARRVRGNSFDSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 67)。

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 68)、CDR2 (SEQ ID NO: 69)、
CDR3 (SEQ ID NO: 70)；

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 71)、FR2 (SEQ ID NO: 72)、
FR3 (SEQ ID NO: 73)、FR4 (SEQ ID NO: 74)。

15 核酸序列

CAGGTTCACTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTT
CTGGCTACGCCTTCACCAACTACCTGATCGACTGGGTCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGC
ATCAACCCTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTAG
CATGACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGCGGG
20 GCAACAGCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 192)。

18A9VHv2:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKPSGYTFTNYLIDWVRQAPGQGLEWMGGINPGSGDTVYNEKFQGRVTLTAD
ESTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARRVRGNSFDSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 75)。

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 76)、CDR2 (SEQ ID NO: 77)、
25 CDR3 (SEQ ID NO: 78)；

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 79)、FR2 (SEQ ID NO: 80)、
FR3 (SEQ ID NO: 81)、FR4 (SEQ ID NO: 82)。

核酸序列

CAGGTTCACTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTT
30 CTGGCTACACCTTCACCAACTACCTGATCGACTGGGTCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGC
ATCAACCCTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACGAGTCTAC
CAGCACCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGCGGG
GCAACAGCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 193)。

18A9VHv3:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKPSGYTFTNYLIDWVRQAPGQGLEWMGGINPGSGDTVYNEKFQGRVTLTAD
35 KSSMTAYMELSSLRSEDVAVYFCARRVRGNSFDSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 83)。

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 84)、CDR2 (SEQ ID NO: 85)、
CDR3 (SEQ ID NO: 86)；

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 87)、FR2 (SEQ ID NO: 88)、
40 FR3 (SEQ ID NO: 89)、FR4 (SEQ ID NO: 90)。

核酸序列

CAGGTTCACTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTT
CTGGCTACACCTTCACCAACTACCTGATCGACTGGGTCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGC
ATCAACCCTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTAG
45 CATGACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGCGGG
GCAACAGCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 194)。

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYLIDWVRQAPGQGLEWMGGINPGSGDVTYNEKFQGRVLTAD
KSSMTAYMELSSLRSEDTAVYFCARRVRGNSFDSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 91)。

无下划线部分从左向右依次分别为FR1 (SEQ ID NO: 95)、FR2 (SEQ ID NO: 96)、FR3 (SEQ ID NO: 97)、FR4 (SEQ ID NO: 98)。

10 CAGGTT CAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCTTGAAGGCTT
CTGGCTACACCTTACCAACTACCTGATCGACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGC
ATCAACCTTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTAG
CATGACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGCGGG
GCAACAGCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 195)。

15 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKPSGYTFTNYLIDWVRQAPGQGLEWMGGINPGSGDITVYNEKFQGRVTITAD
ESTSTAYMELSSLRSEDITAVYFCARRVRGNSFDSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 99)。

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 103)、FR2 (SEQ ID NO: 104)、
20 FR3 (SEQ ID NO: 105)、FR4 (SEQ ID NO: 106)。

25 CAGGTT CAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGCCTT
CTGGCTACACCTTACCAACTACCTGATCGACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGC
ATCAACCTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCATACCGCCGACGAGTCTAC
CAGCACC GCCTACATGGA ACTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCGGTGTA CTCTGTGCCAGAAGAGTGCGGG
GCAACAGCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 196)。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKPSGYAFTNYLIDWVRQAPGGLEWMGGINPGSGDTVYNEKFQGRVLTAD
KSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARRVRGNSFDSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 107)。

无下划线部分从左向右依次分别为FR1 (SEQ ID NO: 111)、FR2 (SEQ ID NO: 112)、FR3 (SEQ ID NO: 113)、FR4 (SEQ ID NO: 114)。

35 CAGGTT CAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCTTGCAAGCCTT
CTGGCTACGCCTTACCAACTACCTGATCGACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGC
ATCAACCTTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTAG
CAGCACC GCCTACATGGA ACTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGCGGG
GCAACAGCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 197)。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKPSGYFTNYLIDWVRQAPGQGLEWMGGINPGSGDITVYNEKFQGRVLTAD
TSTSTVYMEISSLRSEDTAVYFCARRVRGNSFDSWGQGLTVTSS (SEQ ID NO: 115)。

45 无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 119)、FR2 (SEQ ID NO: 120)、FR3 (SEQ ID NO: 121)、FR4 (SEQ ID NO: 122)。

核酸序列

CAGGTTCACTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTT
CTGGCTACACCTTCACCACTACCTGATCGACTGGGTCGACAGGCTCTGGACAGGACTTGAATGGATGGGCGGC
ATCAACCTGGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACACCTCTAC
5 CAGCACCCTGCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGC
GCAACAGCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 198)。

轻链可变区:

18A9VLv1:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS
10 GKDFLTITSLQAEDVAVYYCQNNFYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 123)。

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 124)、CDR2 (SEQ ID NO: 125)、CDR3 (SEQ ID NO: 126)；

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 127)、FR2 (SEQ ID NO: 128)、FR3 (SEQ ID NO: 129)、FR4 (SEQ ID NO: 130)。

15 核酸序列

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGA
GCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCT
AAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGCGTGCCAGATAGATTACAGCGCAGCGGCTCTGGAAGGA
CTTACCCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGAACAATACTTCTACCCCTC
20 TGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO: 199)。

18A9VLv2:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS
GTDFTLTITSLQAEDVAVYYCQNNFYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 131)。

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 132)、CDR2 (SEQ ID NO: 133)、CDR3 (SEQ ID NO: 134)；

无下划线部分从左向右依次分别为 FR1 (SEQ ID NO: 135)、FR2 (SEQ ID NO: 136)、FR3 (SEQ ID NO: 137)、FR4 (SEQ ID NO: 138)。

核酸序列

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGA
30 GCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCT
AAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGCGTGCCAGATAGATTACAGCGCAGCGGCTCTGGAACCGA
CTTACCCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAATACTTCTACCCCTC
TGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO: 200)。

35 实施例 2 人源化抗体药理学研究

1、人源化抗体的亲和力测定 (EC_{50})

取对数生长期的细胞, 3%BSA 封闭 30 分钟以 5×10^4 细胞/100 μ L 铺 U 型 96 孔板, 1100
rpm 离心 3 分钟, 弃上清, 轻轻拍散细胞, 每孔加入 50 μ L 梯度稀释的抗体 (抗体浓度从
40 100nM 起, 5 倍稀释 8 个梯度), 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。孵育结束后, 每孔加入 140 μ L 0.5%BSA
洗 3 次, 加 30 μ L /孔 AF 647 APC 抗人二抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 40 分钟。孵育结束后, 每孔加入
140 μ L 0.5%BSA 洗 3 次, 最后每孔重悬于 50 μ L PBS 进行 iQue (Intellicyt, USA) 检测
(见表 2)。

表 2: 人源化抗体的亲和力测定结果

抗体组合 (名称)	VL	VH	EC_{50} (nM)
18D10 嵌合体	18D10 mVL	18D10 mVH	2.068
h18D10.v11	18D10VLv1	18D10VHv1	1.131

h18D10. v12	18D10VLv1	18D10VHv2	1. 678
h18D10. v13	18D10VLv1	18D10VHv3	0. 912
h18D10. v14	18D10VLv1	18D10VHv4	1. 744
h18D10. v15	18D10VLv1	18D10VHv5	2. 687
h18D10. v16	18D10VLv1	18D10VHv6	2. 313
h18D10. v21	18D10VLv2	18D10VHv1	1. 069
h18D10. v22	18D10VLv2	18D10VHv2	1. 897
h18D10. v23	18D10VLv2	18D10VHv3	0. 982
h18D10. v24	18D10VLv2	18D10VHv4	1. 926
h18D10. v25	18D10VLv2	18D10VHv5	1. 265
h18D10. v26	18D10VLv2	18D10VHv6	1. 874
18A9 嵌合体	18A9 mVL	18A9 mVH	1. 034
h18A9. v11	18A9VLv1	18A9VHv1	0. 645
h18A9. v12	18A9VLv1	18A9VHv2	0. 913
h18A9. v13	18A9VLv1	18A9VHv3	0. 761
h18A9. v14	18A9VLv1	18A9VHv4	0. 548
h18A9. v15	18A9VLv1	18A9VHv5	1. 407
h18A9. v16	18A9VLv1	18A9VHv6	0. 799
h18A9. v17	18A9VLv1	18A9VHv7	1. 425
h18A9. v21	18A9VLv2	18A9VHv1	1. 027
h18A9. v22	18A9VLv2	18A9VHv2	0. 822
h18A9. v23	18A9VLv2	18A9VHv3	1. 170
h18A9. v24	18A9VLv2	18A9VHv4	2. 065
h18A9. v25	18A9VLv2	18A9VHv5	0. 964
h18A9. v26	18A9VLv2	18A9VHv6	1. 405
h18A9. v27	18A9VLv2	18A9VHv7	0. 646

2、CM311 抗体对肿瘤细胞的 ADCC 杀伤活性

取 30 mL 鲜血至 50mL 离心管中，加入 15mL 1×PBS，混和均匀，缓慢加入至已加入 20 mL Ficoll.Paque Plu 的离心管中，使血液铺于 Ficoll.Paque Plu 表面。20℃，2000rpm 离心 30 分钟，弃最上层血清，吸取白膜层（即 PBMC），分装至 50mL 离心管，每管 10mL。每管加入不低于 30 mL 的 1×PBS，混合均匀。4℃，1300 rpm 离心 10 分钟，弃上清，加入 10 mL 1×PBS 清洗并计数。

FBS/RPMI 1640 培养基重悬细胞，37℃，5% CO₂ 培养 2 小时。1300rpm 离心 10 分钟，弃上清，FBS/RPMI 1640 培养基重悬，接种细胞于 U 型 96 孔板中，4×10⁵ 个/孔，50 μL/孔。加入前述 18D10 嵌合体，18A9 嵌合体，抗紧密连接蛋白 18.2 人源化抗体 18D10、18A9（即 CM311，CM311 为人源化抗体 18D10 或 18A9 的统称）以及对照抗体 anti-KLH 的稀释液（40、20、10、5、2.5、1.25 μg/mL），25 μL/孔。37℃，5% CO₂ 孵育 30 分钟。取出孔板，加入 Kato III 细胞，8×10³ 个/孔，25 μL/孔。37℃ 5% CO₂ 孵育 3.5 小时，向靶细胞最大释放孔加入 2 μL 10×裂解液，37℃ 5% CO₂ 继续孵育 30 分钟。取出孔板，1000rpm 离心 3 分钟，取上清至黑色酶标板，50 μL/孔。加入 LDH 检测底物 50 μL/孔，室温孵育 10 分钟，加入终止液 25 μL/孔，终止反应。酶标仪（Biotek）检测。

结果计算如下：

$$\text{杀伤率}\% = \frac{\text{实验孔} - \text{对照孔}}{\text{最大释放孔} - \text{对照孔}} \times 100\%$$

结果如图 4 所示, 抗紧密连接蛋白 18.2 人源化抗体 18D10、18A9 具有较强的 ADCC 活性。

3、CM311 抗体对肿瘤细胞的 CDC 细胞杀伤活性

取对数生长期的 Kato III 细胞重悬至 1×10^7 个/mL。加入 CFSE(Sigma, 87444-5MG-F), 终浓度为 1 μ M。室温孵育 10 分钟, 加入 3 倍体积培养基终止反应。4℃ 1000 rpm 离心 5 分钟, 弃上清, 培养基重悬, 接种细胞至 96 孔板, 1×10^5 个/孔, 50 μ L/孔。加入已稀释的前述 18D10 嵌合体, 18A9 嵌合体, 抗紧密连接蛋白 18.2 人源化抗体 18D10、18A9(CM311) 以及对照抗体 anti-KLH (稀释后浓度为 30、10、3.33、1.11、0.37 μ g/mL), 50 μ L/孔。用培养基稀释补体至 30%, 加入孔板, 50 μ L/孔。37℃, 5% CO₂ 孵育 2 小时, 1000 rpm 离心 3 分钟, 弃上清。1: 200 稀释 PI 染液, 与 Sulfate latex (Invitrogen, S37227) 混匀后加入 96 孔板中, 100 μ L/孔。冰上孵育 10 分钟, FACS 检测。结果如图 5 所示, 抗紧密连接蛋白 18.2 人源化抗体 18D10、18A9 具有较强的 CDC 效应。

实施例 3 抗体药物偶联物的制备和检测

15 1、抗体药物偶联物的制备

取 10 毫克的 CM311 抗体, 使用 15 mL 的 30 KD 超滤装置置换到还原缓冲液 (25 mM 硼酸钠, pH8.0, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA) 中, 共三次置换; 终体积约为 1 mL, 转移至新的 Eppendorf 离心管 (称重) 中, 并称重; 检测蛋白浓度, 计算蛋白总量。向抗体中加入 2.5 倍摩尔数的 DTT, 室温保温 2 小时, 连续混匀; 使用 15mL 的 30KD 超滤装置置换到偶联缓冲液 (50mM Tris, pH7.2, 150mM NaCl, 5 mM EDTA) 中, 共三次置换。取样以 A280 测定蛋白浓度, 并称重, 计算蛋白总量; 取 10 μ L 样品, 以 Ellman's 方法测定自由巯基数;

并以下列公式计算其自由巯基的摩尔浓度:

$$C_{\text{thiol}} = \frac{A_{412} \times 112}{b \times 14150} \text{ (M)}$$

25 b: 比色皿光路长度 (通常 1cm)

根据自由巯基的摩尔浓度和总蛋白溶液体积计算自由巯基摩尔数。

向还原后的抗体中加入 1.1 倍于自由巯基摩尔数的 vc-MMAE 即 MC-vc-PAB-MMAE (溶于 DMSO), 混匀后室温反应 2 小时, 间断混匀。向反应体系中加入 20 倍于所投入之 vc-MMAE (即 MC-vc-PAB-MMAE) 摩尔数的 N-乙酰半胱氨酸于反应液中, 混匀, 静置 5 分钟。使用 30 15 mL 的 30 KD 超滤装置置换到偶联物储存液 (20 mM 组氨酸 (Histidine), 3% 蔗糖 (Sucrose), 0.03% Tween-80, pH5.5) 中, 共三次置换, 即得到抗体药物偶联物产物 Anti-Claudin-18.2-ADC (人源化抗体 18D10 或 18A9 制备的抗体药物偶联物的统称) 于 4℃ 保存。

2、抗体药物偶联物的 DAR 测定

35 抗体药物偶联物的载药量 (DAR) 是用疏水作用色谱法 (HIC-HPLC) 检测而得的。

典型的抗体药物偶联物 CM311-18D10-VH6/VL1-ADC 的图谱见图 6。根据该图谱峰面积计算得到平均载药数 DAR 为 3.8。

类似地可得, 抗体药物偶联物 CM311-18D10-VH3/VL2-ADC 的平均载药数 DAR 为 3.5。

抗体药物偶联物 CM311-18D10-VH6/VL2-ADC 的平均载药数 DAR 为 3.4。

40 抗体药物偶联物 CM311-18A9-VH7/VL2-ADC 的平均载药数 DAR 为 3.0。

需要说明的是, 以上抗体药物偶联物的名称如 CM311-18D10-VH6/VL1-ADC, 其表示制备该抗体药物偶联物时使用的抗体为 CM311-18D10-VH6/VL1。进一步地, 该抗体名称 CM311-18D10-VH6/VL1 表示制备前述抗体药物偶联物时使用的抗体为 18D10 这一类中重链可变区为 VHv6 且轻链可变区为 VLv1 的抗体, 对应上表 2 可知, 制备前述抗体药物偶联物时使用的具体抗体为 h18D10.v16。其余三种抗体药物偶联物 CM311-18D10-VH3/VL2-ADC、CM311-18D10-VH6/VL2-ADC、CM311-18A9-VH7/VL2-ADC 的名称可参照前述进行理解。具体

地，制备抗体药物偶联物 CM311-18D10-VH3/VL2-ADC 时使用的具体抗体为表 2 中的 h18D10.v23；制备抗体药物偶联物 CM311-18D10-VH6/VL2-ADC 时使用的具体抗体为表 2 中的 h18D10.v26；制备抗体药物偶联物 CM311-18A9-VH7/VL2-ADC 时使用的具体抗体为表 2 中的 h18A9.v27。

5

实施例 4 抗体药物偶联物体外药效学研究

复苏后的细胞株经过 1-2 代细胞传代之后，先吸取上清液至 15 mL 离心管内，离心机离心，弃上清；用 5 mL PBS 润洗细胞培养瓶，再用 2 mL 胰蛋白酶消化细胞，用培养基重悬至之前的 15 mL 离心管内，离心机离心，弃上清，再用培养基再次重悬，取出 0.5 mL 用细胞计数仪计数。在 96 孔细胞培养板上进行铺板（LT-1C8 细胞以 5000 或 10000 个细胞/孔，LT-M11 细胞以 5000 个细胞/孔，BxPC-3 以 3000 个细胞/孔），培养 24 小时后，加入系列稀释浓度的抗体药物偶联物 CM311ADC（由不同 CM311 单抗偶联而成）保温 96 小时，之后每孔加入 CCK-8 或者 Presto-Blue 显色试剂，用酶标仪检测并进行四参数拟合。

10

实验试剂及来源：

15

受试药物

抗体药物偶联物名称	浓度	保存条件
CM311-18D10-VH3/VL2-ADC	1.0 mg/mL	2-8℃
CM311-18D10-VH6/VL1-ADC	1.2 mg/mL	2-8℃
CM311-18D10-VH6/VL2-ADC	0.9 mg/mL	2-8℃
CM311-18A9-VH7/VL2-ADC	0.7 mg/mL	2-8℃

细胞株

细胞株	细胞类型	Claudin18.2 表达水平	来源	培养液
LT-M11	KATO 稳转细胞系	高表达	康诺亚生物医药科技(成都)有限公司	IMDM+20%FBS
LT-1C8	KATO 稳转细胞系	中表达	康诺亚生物医药科技(成都)有限公司	IMDM+20%FBS

实验结果：

各 CM311ADC 的 IC₅₀ 的平均值见表 3。图 7 为不同 CM311ADC 对 LT-M11 细胞杀伤的代表性图。

20

表 3：不同 CM311ADC 在所筛选的细胞株中的 IC₅₀ 值

细胞株	CM311-18D10-VH3/VL2-ADC IC ₅₀ 平均值	CM311-18D10-VH6/VL1-ADC IC ₅₀ 平均值	CM311-18D10-VH6/VL2-ADC IC ₅₀ 平均值	CM311-18A9-VH7/VL2-ADC IC ₅₀ 平均值
-----	---	---	---	--

	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)
LT-1C8	520.5	253.9	615.1	111.1
LT-M11	200.3	113.8	349.6	155.5
	131.5	51.07	146.6	51.22
BxPC-3	5295	4632	4237	4045

注：图 7 中：

Sample 1: CM311-18D10-VH3/VL2-ADC

Sample 2: CM311-18D10-VH6/VL1-ADC

Sample 3: CM311-18D10-VH6/VL2-ADC

5 Sample 4: CM311-18A9-VH7/VL2-ADC

从表 3 和图 7 的结果可以看出，不同 CM311ADC 在 Claudin18.2 中、高度表达的细胞株中均表现出显著的细胞杀伤活性，在 Claudin18.2 阴性的 BxPC-3 细胞株中无显著细胞杀伤活性。

10 实施例 5 抗体药物偶联物体内药效学研究

CM311ADC 的抗肿瘤活性在 ST0#025 和 ST0#523 两个胃癌 PDX 模型中进行了测试。这两个胃癌模型都有较高的 Claudin 18 mRNA 水平。

人胃癌裸小鼠 PDX 模型的建立过程为：将体积大小约为 15-30 mm³ 的肿瘤组织移植于 BALB/c 裸小鼠背部皮下。当肿瘤体积达到 150-260 mm³ 时，用随机区组法分组，每组 5 只小鼠，保证各组间肿瘤体积均一并兼顾体重，共 4 组，包括溶媒组、1 mg/kg CM311-ADC-1 给药组、3 mg/kg CM311-ADC-1 给药组和 3 mg/kg CM311-ADC-2（非结合对照 ADC）给药组。其中，CM311-ADC-1 指的是抗体药物偶联物 CM311-18D10-VH6/VL1-ADC；CM311-ADC-2 相比于 CM311-ADC-1，抗体是人 IgG1 同型对照，与肿瘤细胞表面的靶点无结合。

20 数据分析：实验期间，每周测定两次肿瘤体积。肿瘤体积（Tumor Volume, TV）的计算公式为：TV = 1/2 × w² × l。其中 l、w 分别代表肿瘤测量长和宽。根据测量结果计算出相对肿瘤体积（relative tumor volume, RTV），RTV = V_t / V₀。其中 V₀ 为分组给药时（即 Day 0）测量所得肿瘤体积，V_t 为最后一天测量的肿瘤体积。相对肿瘤增殖率 T/C(%) = (给药组 RTV / Vehicle 组 RTV) × 100%。肿瘤生长抑制率 TGI% = (Vehicle 组平均肿瘤体积 - 给药组平均肿瘤体积) / Vehicle 组平均肿瘤体积 × 100%。当 T/C(%) ≤ 40%，且 P < 0.05 时认为供试品对肿瘤生长有显著抑制作用。

25 实验结果：

1) CM311ADC 在 Claudin 18 mRNA 高表达水平的人胃癌 PDX 模型 ST0#025 中的疗效研究

30 实验结果如图 8 和图 9 所示。CM311-ADC-1 按 1 和 3 mg/kg 剂量给药后，Day 28 的相对肿瘤增殖率 T/C(%) 分别为 29.86% 和 0%，肿瘤生长抑制率 TGI% 分别为 70.13% 和 100%，分别有 0/5 和 5/5 的肿瘤完全消退，以及 2/5 和 0/5 的肿瘤部分消退；CM311-ADC-2(3 mg/kg) 组 T/C(%) 为 67.24%，TGI% 为 32.76%，实验结果表明，CM311-ADC-1(3 mg/kg) 和 CM311-ADC-1(1 mg/kg) 均具有显著抑制肿瘤生长的活性，CM311-ADC-2(3 mg/kg) 无显著抗肿瘤活性。荷瘤小鼠对 CM311-ADC-1 和 CM311-ADC-2 均有很好的耐受性。

35 2) CM311ADC 在 Claudin 18 mRNA 高表达水平的人胃癌 PDX 模型 ST0#523 中的疗效研究

实验结果如图 10 和图 11 所示。CM311-ADC-1 按 1 和 3 mg/kg 剂量给药后，Day 28 的相对肿瘤增殖率 T/C(%) 分别为 35.60% 和 6.79%，肿瘤生长抑制率 TGI% 分别为 64.40%

和 93.21%；CM311-ADC-2（3 mg/kg）组 T/C（%）为 114.81%，TGI%为-14.81%，实验结果表明，CM311-ADC-1（3 mg/kg）和 CM311-ADC-1（1 mg/kg）均具有显著抑制肿瘤生长的活性，CM311-ADC-2（3 mg/kg）无显著抗肿瘤活性。荷瘤小鼠对 CM311-ADC-1 和 CM311-ADC-2 均有很好的耐受性。

5

实施例 6 抗体与抗体药物偶联物的体外细胞活性比较
测试方法：

KATO III 细胞株以 5000 cells/孔铺板，24 小时后加入待测样品。待测样品均以终浓度 1000 ng/mL 2.4 倍稀释 9 次，作用 96 小时，Presto-Blue 显色 60min 后使用酶标仪读取荧光值。

10

待测样品如下：
Sample1: CM311，具体为 CM311-18D10-VH6/VL1；
Sample2: Anti-Claudin-18.2-ADC，具体为 CM311-18D10-VH6/VL1-ADC；
Sample3: 非结合对照 ADC，具体为 IgG-L1D1（IgG-L1D1 即 IgG 抗体偶联了 L1D1 小分子（即 vcMMAE，也就是 MC-vc-PAB-MMAE）药物的 ADC）。

15

测试结果如图 12 和表 4 所示。从图 12 中可以看出，Anti-Claudin-18.2-ADC（例如 CM311-18D10-VH6/VL1-ADC）显示很强的细胞杀伤作用，EC₅₀ 值为 16.37 ng/mL；而 CM311（例如 CM311-18D10-VH6/VL1）和 IgG-L1D1 均未显示明显的细胞杀伤作用。

20

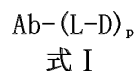
表 4：抗体与抗体药物偶联物的体外细胞活性比较结果（4 参数拟合结果）

Curve Fit : 4-Parameter $y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^S}$

	Parameter	Estimated Value	Std. Error	Confidence Interval
CM311 $R^2 = 0.939$ $EC_{50} = 1.29e+13$	A	4.087	0.017	[4.046, 4.127]
	B	0.516	0.571	[-0.881, 1.913]
	C	1.29e+13	6.41e+18	[-1.57e+19, 1.57e+19]
	D	-2.42e+4	6.19e+9	[-1.51e+10, 1.51e+10]
Anti-Claudin-18.2-ADC $R^2 = 0.997$ $EC_{50} = 16.37$	A	4.107	0.017	[4.066, 4.148]
	B	1.437	0.149	[1.073, 1.801]
	C	16.37	1.287	[13.22, 19.52]
	D	3.337	0.015	[3.299, 3.375]
IgG-L1D1 $R^2 = 0.980$ $EC_{50} = 9.04e+12$	A	4.098	0.013	[4.065, 4.130]
	B	0.555	0.330	[-0.253, 1.362]
	C	9.04e+12	4.62e+18	[-1.13e+19, 1.13e+19]
	D	-7.86e+4	2.23e+10	[-5.45e+10, 5.45e+10]

权 利 要 求

1. 抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，所述抗体药物偶联物具有式 I 所示的结构，



其中：

Ab 为抗 Claudin 18.2 抗体，所述抗 Claudin 18.2 抗体包含重链和轻链，重链可变区 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 2、10、18、26、34、42、68、76、84、92、100、108 或 116 所示的序列或其突变体，重链可变区 CDR2 包含选自 SEQ ID NO: 3、11、19、27、35、43、69、77、85、93、101、109 或 117 所示的序列或其突变体，重链可变区 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 4、12、20、28、36、44、70、78、86、94、102、110 或 118 所示的序列或其突变体，轻链可变区 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 50、58、124 或 132 所示的序列或其突变体，轻链可变区 CDR2 包含选自 SEQ ID NO: 51、59、125 或 133 所示的序列或其突变体，轻链可变区 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 52、60、126 或 134 所示的序列或其突变体；

D 为细胞毒剂；

L 为接头，用于连接所述抗 Claudin 18.2 抗体和所述细胞毒剂；

p 为 2.0-8.0。

2. 权利要求 1 的抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中：

所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 2、10、18、26、34 或 42 所示的序列或其突变体，重链可变区 CDR2 包含选自 SEQ ID NO: 3、11、19、27、35 或 43 所示的序列或其突变体，重链可变区 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 4、12、20、28、36 或 44 所示的序列或其突变体，轻链可变区 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 50 或 58 所示的序列或其突变体，轻链可变区 CDR2 包含选自 SEQ ID NO: 51 或 59 所示的序列或其突变体，轻链可变区 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 52 或 60 所示的序列或其突变体；

或者，所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 68、76、84、92、100、108 或 116 所示的序列或其突变体，重链可变区 CDR2 包含选自 SEQ ID NO: 69、77、85、93、101、109 或 117 所示的序列或其突变体，重链可变区 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 70、78、86、94、102、110 或 118 所示的序列或其突变体，轻链可变区 CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 124 或 132 所示的序列或其突变体，轻链可变区 CDR2 包含选自 SEQ ID NO: 125 或 133 所示的序列或其突变体，轻链可变区 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 126 或 134 所示的序列或其突变体；

或者，所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 选自如下序列组合：

- (1) SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4，
- (2) SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12，
- (3) SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20，
- (4) SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28，
- (5) SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36，
- (6) SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44，
- (7) SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70，
- (8) SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 78，
- (9) SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 86，
- (10) SEQ ID NO: 92、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 94，

- (11) SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 102,
- (12) SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 110,
- (13) SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118,

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 选自如下序列组合:

- (1) SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52,
- (2) SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60,
- (3) SEQ ID NO: 124、SEQ ID NO: 125、SEQ ID NO: 126,
- (4) SEQ ID NO: 132、SEQ ID NO: 133、SEQ ID NO: 134;

优选地, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 选自如下序列组合:

- (1) SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4,
- (2) SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12,
- (3) SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20,
- (4) SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28,
- (5) SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36,
- (6) SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44,

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 选自如下序列组合:

- (1) SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52,
- (2) SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60;

或者优选地, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 选自如下序列组合:

- (1) SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70,
- (2) SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 78,
- (9) SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 86,
- (4) SEQ ID NO: 92、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO: 94,
- (5) SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 102,
- (6) SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 110,
- (7) SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118,

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 选自如下序列组合:

- (1) SEQ ID NO: 124、SEQ ID NO: 125、SEQ ID NO: 126,
- (2) SEQ ID NO: 132、SEQ ID NO: 133、SEQ ID NO: 134。

3. 权利要求 1 的抗体药物偶联物, 其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物, 其中:

所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 FR1 包含选自 SEQ ID NO: 5、13、21、29、37、45、71、79、87、95、103、111 或 119 所示的序列或其突变体, 重链可变区 FR2 包含选自 SEQ ID NO: 6、14、22、30、38、46、72、80、88、96、104、112 或 120 所示的序列或其突变体, 重链可变区 FR3 包含选自 SEQ ID NO: 7、15、23、31、39、47、73、81、89、97、105、113 或 121 所示的序列或其突变体, 重链可变区 FR4 包含选自 SEQ ID NO: 8、16、24、32、40、48、74、82、90、98、106、114 或 122 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR1 包含选自 SEQ ID NO: 53、61、127 或 135 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR2 包含选自 SEQ ID NO: 54、62、128 或 136 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR3 包含选自 SEQ ID NO: 55、63、129 或 137 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 FR4 包含选自 SEQ ID NO: 56、64、130 或 138 所示的序列或其突变体;

优选地, 所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 FR1 包含选自 SEQ ID NO: 5、13、21、29、37 或 45 所示的序列或其突变体, 重链可变区 FR2 包含选自 SEQ ID NO: 6、14、

22、30、38 或 46 所示的序列或其突变体，重链可变区 FR3 包含选自 SEQ ID NO: 7、15、23、31、39 或 47 所示的序列或其突变体，重链可变区 FR4 包含选自 SEQ ID NO: 8、16、24、32、40 或 48 所示的序列或其突变体，轻链可变区 FR1 包含选自 SEQ ID NO: 53 或 61、所示的序列或其突变体，轻链可变区 FR2 包含选自 SEQ ID NO: 54 或 62 所示的序列或其突变体，轻链可变区 FR3 包含选自 SEQ ID NO: 55 或 63 所示的序列或其突变体，轻链可变区 FR4 包含选自 SEQ ID NO: 56 或 64 所示的序列或其突变体；

或者优选地，所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 FR1 包含选自 SEQ ID NO: 71、79、87、95、103、111 或 119 所示的序列或其突变体，重链可变区 FR2 包含选自 SEQ ID NO: 72、80、88、96、104、112 或 120 所示的序列或其突变体，重链可变区 FR3 包含选自 SEQ ID NO: 73、81、89、97、105、113 或 121 所示的序列或其突变体，重链可变区 FR4 包含选自 SEQ ID NO: 74、82、90、98、106、114 或 122 所示的序列或其突变体，轻链可变区 FR1 包含选自 SEQ ID NO: 127 或 135 所示的序列或其突变体，轻链可变区 FR2 包含选自 SEQ ID NO: 128 或 136 所示的序列或其突变体，轻链可变区 FR3 包含选自 SEQ ID NO: 129 或 137 所示的序列或其突变体，轻链可变区 FR4 包含选自 SEQ ID NO: 130 或 138 所示的序列或其突变体；

或者优选地，所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 选自如下序列组合：

- (1) SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8，
- (2) SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16，
- (3) SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24，
- (4) SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32，
- (5) SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40，
- (6) SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 48，
- (7) SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74，
- (8) SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 82，
- (9) SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 90，
- (10) SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 97、SEQ ID NO: 98，
- (11) SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106，
- (12) SEQ ID NO: 111、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 113、SEQ ID NO: 114，
- (13) SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 122，

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 选自如下序列组合：

- (1) SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56，
- (2) SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64，
- (3) SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 128、SEQ ID NO: 129、SEQ ID NO: 130，
- (4) SEQ ID NO: 135、SEQ ID NO: 136、SEQ ID NO: 137、SEQ ID NO: 138；

更优选地，所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 选自如下序列组合：

- (1) SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8，
- (2) SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16，
- (3) SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24，
- (4) SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32，
- (5) SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40，
- (6) SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 48，

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 选自如下序列组合：

- (1) SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56，
- (2) SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64；

或者更优选地，所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 选自如下序列组合：

- (1) SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74，
- (2) SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 82，
- (3) SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 90，
- (4) SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 97、SEQ ID NO: 98，
- (5) SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106，
- (6) SEQ ID NO: 111、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 113、SEQ ID NO: 114，
- (7) SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 122，

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 选自如下序列组合：

- (1) SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 128、SEQ ID NO: 129、SEQ ID NO: 130，
- (2) SEQ ID NO: 135、SEQ ID NO: 136、SEQ ID NO: 137、SEQ ID NO: 138。

4. 权利要求 1 的抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中：

所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区选自 SEQ ID NO: 1、9、17、25、33、41、67、75、83、91、99、107 或 115 所示的序列，

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区选自 SEQ ID NO: 49、57、123 或 131 所示的序列；

优选地，所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区选自 SEQ ID NO: 1、9、17、25、33 或 41 所示的序列，

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区选自 SEQ ID NO: 49 或 57 所示的序列；

或者优选地，所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区选自 SEQ ID NO: 67、75、83、91、99、107 或 115 所示的序列，

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链可变区选自 SEQ ID NO: 123 或 131 所示的序列。

5. 权利要求 1 的抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中：

所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区、轻链可变区选自如下序列组合：

- (1) SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 57；
- (2) SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 49；
- (3) SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 57；
- (4) SEQ ID NO: 115 和 SEQ ID NO: 131；

优选地，所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链可变区、轻链可变区的序列分别为 SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 49。

6. 权利要求 1 的抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中：

所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链恒定区选自人源性 IgG(如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)、IgM、IgA、IgD、IgA 恒定区或上述恒定区的突变体，优选为人源性 IgG1；

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链恒定区选自人源性 lambda 恒定区、kappa 恒定区或上述恒定区的突变体，优选为人源性 kappa 恒定区。

7. 权利要求 1 的抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中：

所述抗 Claudin 18.2 抗体的重链的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO: 65 所示的序列，

或者包含与 SEQ ID NO: 65 所示序列的同一性大于 70%，例如大于 75%、80%、85%、90%、95%、99% 的序列；

所述抗 Claudin 18.2 抗体的轻链的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO: 66 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO: 66 所示序列的同一性大于 70%，例如大于 75%、80%、85%、90%、95%、99% 的序列。

8. 权利要求 1 的抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中，p 为 2.0-7.0、2.0-6.0、2.0-5.0、2.0-4.0、3.0-7.0、3.0-6.0、3.0-5.0 或 3.0-4.0，优选地，p 为 3.0-4.0，例如 p 为 3.0-3.8，优选为 3.0、3.4、3.5 或 3.8，更优选为 3.8。

9. 权利要求 1 的抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中，所述细胞毒剂选自 SN-38、吉西他滨 (Gemcitabine)、Monomethyl auristatin E (MMAE)、Monomethyl auristatin F (MMAF)、美登木素生物碱 (例如 Maytansine DM1、Maytansine DM4)、卡奇霉素 (calicheamicin)、MGBA (如 duocarmycin)、阿霉素 (doxorubicin)、蓖麻毒素、白喉毒素等毒素、I131、白介素类、肿瘤坏死因子、趋化因子和纳米颗粒；

优选地，所述细胞毒剂为 MMAE。

10. 权利要求 1 的抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中，所述接头选自 6-马来酰亚氨基己酰基 (MC)、马来酰亚氨基丙酰基 (MP)、N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯 (SPP)、4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-甲酰基 (MCC)、N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯 (SIAB)、和 6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基 (MC-vc-PAB)；

优选地，所述接头为 6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基 (MC-vc-PAB)。

11. 权利要求 1 的抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中：

Ab 包括：

(a) 重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 和轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3，其中，重链可变区 CDR1 的序列如 SEQ ID NO: 42 所示，重链可变区 CDR2 的序列如 SEQ ID NO: 43 所示，重链可变区 CDR3 的序列如 SEQ ID NO: 44 所示，轻链可变区 CDR1 的序列如 SEQ ID NO: 50 所示，轻链可变区 CDR2 的序列如 SEQ ID NO: 51 所示，轻链可变区 CDR3 的序列如 SEQ ID NO: 52 所示；

(b) 重链可变区和轻链可变区，其中，重链可变区的序列如 SEQ ID NO: 41 所示，轻链可变区的序列如 SEQ ID NO: 49 所示；和/或

(c) 重链和轻链，其中，重链的序列如 SEQ ID NO: 65 所示，轻链的序列如 SEQ ID NO: 66 所示；

L 为 MC-vc-PAB；和

D 为 MMAE。

12. 组合物，其包含权利要求 1-11 任一项所述的抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物；任选地，还包含已知的用于治疗肿瘤的化疗药物、免疫治疗药物和免疫抑制剂中的至少一种；或者任选地，还包含至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

13. 权利要求 1-11 任一项所述的抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物或者权利要求 12 所述的组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗与 Claudin 18.2 相关的疾病；

优选地，所述与 Claudin 18.2 相关的疾病为胃癌、胃食管交界腺癌、胰腺癌；

更优选地，所述与 Claudin 18.2 相关的疾病为胃癌。

14. 预防和/或治疗与 Claudin 18.2 相关的疾病的方法，其包括：给予有需要的受试者预防和/或治疗有效量的权利要求 1-11 任一项所述的抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，或者权利要求 12 所述的组合物；

优选地，所述与 Claudin 18.2 相关的疾病为胃癌、胃食管交界腺癌、胰腺癌；

更优选地，所述与 Claudin 18.2 相关的疾病为胃癌。

15. 权利要求 1-11 任一项所述的抗体药物偶联物，其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，或者权利要求 12 所述的组合物，其用于预防和/或治疗与 Claudin 18.2 相关的疾病；

优选地，所述与 Claudin 18.2 相关的疾病为胃癌、胃食管交界腺癌、胰腺癌；

更优选地，所述与 Claudin 18.2 相关的疾病为胃癌。