

一种抗 Claudin18.2 抗体及其抗体药物偶联物

技术领域

[01] 本发明涉及生物医药领域，尤其涉及一种抗 Claudin18.2 抗体及其抗体药物偶联物，本发明还涉及上述抗体及其抗体药物偶联物的用途。

背景技术

[02] 近年来，全球恶性肿瘤的总体发病率呈现持续升高的趋势，严重威胁着人类的健康和生存。目前临床上治疗恶性肿瘤主要以手术、化疗和放疗为主，但是都很难达到满意的疗效。抗体药物偶联物(antibody-drug conjugate, ADC)是一种通过化学连接子(Linker)将具有生物活性的药物(Drug)和抗体(Antibody)连接起来的一类生物药。近些年，多个抗体药物偶联物在治疗恶性肿瘤方面取得了突破性的进展，使其成为了继手术、化疗、放疗后的一大新兴治疗方法。但截止到 2021 年 3 月，全球仅批准了 11 种抗体偶联药物(美国 FDA 批准了 10 种，日本 PMDA 批准了一种)，且获批适应症种类较少，远不能满足目前恶性肿瘤患者的临床需求。

表 1 已上市抗体药物偶联物

药品通用名	公司	靶点	上市时间
Brentuximab vedotin	Seattle、武田	CD30	上市/2011 年
Ado-trastuzumab emtansine	基因泰克	Her2	上市/2013 年
Inotuzumab ozogamicin	辉瑞	CD22	上市/2017 年
Gemtuzumab ozogamicin	辉瑞	CD33	上市/2017 年
Moxetumomab pasudotox-tdfk	阿斯利康	CD22	上市/2018 年
Enfortumab vedotin-ejfv	西雅图/安斯泰来	Nectin-4	上市/2019 年
Polatuzumab vedotin-piiq	基因泰克	CD79b	上市/2019 年
Fam-trastuzumab deruxtecan-nxki	阿斯利康/日本第一三共	Her2	上市/2019 年
Sacituzumab govitecan-hziy	Immunomedics	Trop2	上市/2020 年

Belantamab mafodotin	Glaxosmithkline (Ireland) Ltd	BCMA	上市/2020 年
Cetuximab sarotalocan	Rakuten Medical	EGFR	上市/2020 年

注：Mylotarg 于 2000 年获批上市后在 2010 年撤市，后于 2017 年重新获批上市。

[03] 细胞连接密蛋白(Claudins 或 CLDNs)广泛分布于各种上皮组织，是细胞紧密连接的重要结构成分。研究发现，CLDNs 蛋白与上皮细胞维持渗透压、屏障功能以及细胞极性密切相关（文献 1：Gunzel D. Claudins: vital partners in transcellular and paracellular transport coupling[J]. Pflugers Arch, 2017, 469(1):35-44.），且参与对病原体的免疫防御过程（文献 2：Colpitts CC, Baumert TF. Claudins in viral infection: from entry to spread[J]. Pflugers Arch, 2017, 469(1):27-34.）。另外，CLDNs 被证实存在许多肿瘤的发生发展过程中存在表达模式的改变，将 CLDNs 谱系作为特异性标志蛋白的靶向治疗研究已得到广泛关注。但是，尽管大部分的 CLDNs 广泛表达，但其中的个别成员如 CLDN 18 蛋白往往高度选择性地表达于胃肠道等特定组织。CLDN 18 基因位于人第 3 号染色体的 3q22.3，其基因第一个外显子有两种选择，由此形成两种不同的剪切突变体，可表达出 N 端 69 个不同氨基酸序列的两种蛋白亚型，分别为 Claudin 18.1 蛋白和 CLDN 18.2 蛋白（文献 3：Hayashi D, Tamura A, Tanaka H, et al. Deficiency of claudin- 18 causes paracellular H + leakage, up- regulation of interleukin- 1 β ,and atrophic gastritis in mice[J]. Gastroenterology, 2012, 142(2):292-304.），其中 Claudin 18.1 蛋白是肺泡上皮细胞选择性表达的特异性抗原，仅在正常肺泡组织中高度表达，而在其他正常组织包括胰管等组织均未发现（文献 4：Li G, Flodby P, Luo J, et al. Knockout mice reveal key roles for clau - din 18 in alveolar barrier properties and fluid homeostasis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014, 51(2):210-222.）；Claudin 18.2 蛋白也是一种具有高度选择性的标志蛋白，但其分布的组织与 Claudin 18.1 蛋白完全不同。Claudin 18.2 蛋白在正常健康组织中表达高度受限，但在胃癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、支气管癌以及非小细胞肺癌等多种原发恶性肿瘤中异常激活和过度表达，尤其好发于消化系统恶性肿瘤，包括胃癌(70%)，胰腺癌(50%)，食管癌(30%)等（文献 5：Kumar V, Soni P, Garg M, et al. Emerging Therapies in the Manage - ment of Advanced-Stage Gastric Cancer[J]. Front Pharmacol, 2018, 9:404.）。另有研究表明，CLDN 18.2 蛋白的表达并不局限于原发灶，在

转移灶中也高度表达，可能参与恶性肿瘤细胞增殖和趋化转移的过程(文献 6：Woll S, Schlitter AM, Dhaene K, et al. Claudin 18.2 is a target for IMAB362 antibody in pancreatic neoplasms[J]. Int J Cancer, 2014, 134(3):731-739;文献 7：Jiang H, Shi Z, Wang P, et al. Claudin18.2-Specific Chimeric Antigen Receptor Engineered T Cells for the Treatment of Gastric Cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2018, 111(4):1-10.)。因此，Claudin 18.2 是一种非常理想的肿瘤患者标记物和抗肿瘤药物开发靶点，特别是胃癌、胰腺癌、食管癌、肺癌、卵巢癌等，但是由于其靶点的特殊性(结构与 Claudin 18.1 高度相似，且二者胞外区第一结构域完全相同)，Claudin 18.2 治疗性抗体的开发非常困难，这也是限制 Claudin 18.2 靶向药物开发的主要原因。

[04] 目前靶向 Claudin 18.2 的抗体药物偶联物均处于临床前研究阶段，尚无一款推进到临床阶段。因此，开发靶向 Claudin 18.2 的抗体药物偶联物为临床提供更多的选择已迫在眉睫。

发明内容

[05] 本发明提供了一种靶向 Claudin 18.2 的抗体、抗体药物偶联物及其在治疗癌症中的用途。本发明还提供了编码上述 Claudin 18.2 抗体的核苷酸、多核苷酸组合、表达载体及表达载体组合、包含上述 Claudin 18.2 的抗体、抗体药物偶联物的药物组合物以及它们在制备治疗或预防癌症药物中的应用。

[06] 具体的，本发明提供了一种抗 Claudin18.2 抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区的 CDR 和/或所述轻链可变区的 CDR 与如下序列限定的抗体具有相同的 CDR 序列或在如下序列限定的抗体的 CDR 上进行 1-2 个氨基酸替换，所述序列限定的抗体为：

- (1) 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 所示；和/或
- (2) 轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:2 所示。

[07] 在特定实施方案中，根据采用不同的测定方法或系统认定，相应重链和轻链可变区的互补决定区 CDR1-3 如表 2 所示。

表 2 重链和轻链可变区 CDR1-3 氨基酸序列

类别	系统	CDR1	CDR2	CDR3
----	----	------	------	------

重链	Chothia	SEQ ID NO:3 GYAFTNY	SEQ ID NO:8 NPGSGG	SEQ ID NO:13 GGYYGNSFAY
	AbM	SEQ ID NO:4 GYAFTNYLIE	SEQ ID NO:9 LINPGSGGTN	SEQ ID NO:14 GGYYGNSFAY
	Kabat	SEQ ID NO:5 NYLIE	SEQ ID NO:10 LINPGSGGTNYNEKFKG	SEQ ID NO:15 GGYYGNSFAY
	Contact	SEQ ID NO:6 TNYLIE	SEQ ID NO:11 WMGLINPGSGGTN	SEQ ID NO:16 ARGGYYGNSFA
	IMGT	SEQ ID NO:7 GYAFTNYL	SEQ ID NO:12 INPGSGGT	SEQ ID NO:17 ARGGYYGNSFAY
轻链	Chothia	SEQ ID NO:18 KSSQSLLNSGNQKNYLT	SEQ ID NO:23 WASTRES	SEQ ID NO:28 QNAYYYPYT
	AbM	SEQ ID NO:19 KSSQSLLNSGNQKNYLT	SEQ ID NO:24 WASTRES	SEQ ID NO:29 QNAYYYPYT
	Kabat	SEQ ID NO:20 KSSQSLLNSGNQKNYLT	SEQ ID NO:25 WASTRES	SEQ ID NO:30 QNAYYYPYT
	Contact	SEQ ID NO:21 LNSGNQKNYLTWY	SEQ ID NO:26 LLIYWASTRE	SEQ ID NO:31 QNAYYYPY
	IMGT	SEQ ID NO:22 QSLLNSGNQKNY	SEQ ID NO:27 WAS	SEQ ID NO:32 QNAYYYPYT

[08] 进一步的,本发明还提供了一种抗 Claudin18.2 抗体或抗原结合片段,在某些具体实施方案中,其包含重链和轻链可变区序列,其中

(1)重链可变区 CDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO:3、4、5、6 或 7 所示或对 SEQ ID NO:3、4、5、6 或 7 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; CDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO:8、9、10、11 或 12 所示或对 SEQ ID NO:8、9、10、11 或 12 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; CDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO:13、14、15、16 或 17 所示或对 SEQ ID NO:13、14、15、16 或 17 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列;

(2)轻链可变区 CDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO:18、19、20、21 或 22 所示或对 SEQ ID NO:18、19、20、21 或 22 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；CDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO:23、24、25、26 或 27 所示或对 SEQ ID NO:23、24、25、26 或 27 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；CDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO:28、29、30、31 或 32 所示或对 SEQ ID NO:28、29、30、31 或 32 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列。

[09] 进一步的，本发明提供的抗 Claudin18.2 抗体或抗原结合片段，在某些具体的实施方案中，其中：

(1)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:3、8、13 或对 SEQ ID NO:3、8、13 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:18、23、28 或对 SEQ ID NO:18、23、28 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；

(2)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:4、9、14 或对 SEQ ID NO:4、9、14 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:19、24、29 或对 SEQ ID NO:19、24、29 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；

(3)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:5、10、15 或对 SEQ ID NO:5、10、15 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:20、25、30 或对 SEQ ID NO:20、25、30 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；

(4)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:6、11、16 或对 SEQ ID NO:6、11、16 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:21、26、31 或对 SEQ ID NO:21、26、31 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；

(5)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:7、12、17 或对 SEQ ID NO:7、12、17 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:22、27、32 或对 SEQ ID NO:22、27、32 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列。

[10] 在某些具体实施方案中，本发明所提供的抗体或其抗原结合片段，其包括选自如下一组的可变区：

(1)重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，或与 SEQ ID

NO:1 具有相同的 CDR 1-3 且与 SEQ ID NO:1 相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列；和/或

(2) 轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，或与 SEQ ID NO:2 具有相同的 CDR 1-3 且与 SEQ ID NO:2 相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列。

[11] 在特定的实施例中，本发明涉及的抗 Claudin18.2 抗体的重链可变区氨基酸序列如下 (SEQ ID NO:1)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYAFT NYLIEWVRQA PGQGLEWMGL INPGSGGTNY 60

NEKFKGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARGG YGNSFAYWG QGTLVTVSS 119

[12] 在特定的实施例中，本发明涉及的抗 Claudin18.2 抗体的轻链可变区氨基酸序列如下 (SEQ ID NO:2)：

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYLQKPGQSP QLLIYWASTR 60

ESGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQAYYY PYTFGGGTKV EIK 113

[13] 在特定的实施例中，本发明涉及的抗 Claudin18.2 的：(1) 重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示；和/或 (2) 轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

[14] 在某些具体实施方案中，本发明所提供的抗体或其抗原结合片段，其中：(1) 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:33 所示；和/或 (2) 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示。

[15] 本发明所提供的抗体可以是单克隆抗体、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、单链 Fv ("scFv")、双抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体或包含抗体的抗原结合部分的融合蛋白；优选的，所述的抗体为人源化单克隆抗体。

[16] 本发明所提供的抗体进一步包括人或鼠恒定区；优选的，所述恒定区选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。

[17] 本发明还提供了一种抗体药物偶联物，其含有前述任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

[18] 进一步的，所述的抗体药物偶联物结构如式(I)所示：



其中：

Ab 为前述任一项所述的抗体或其抗原结合片段；

D 为活性药物单元；

L 为任一连接基团，其分别与抗体或其抗原结合片段 Ab 及活性药物单元 D 共价连接；

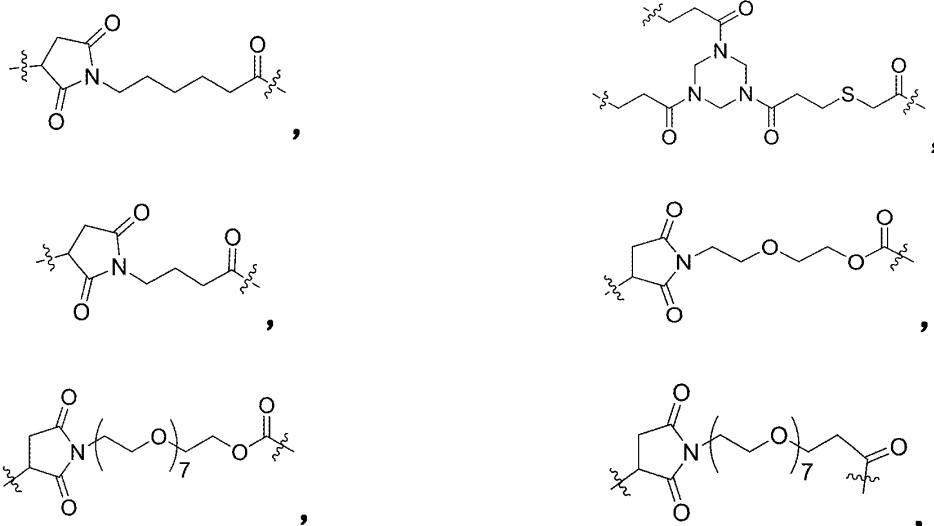
5 其中，所述 Ab 上通过一个或多个连接基团 L 连接一个或多个活性药物单元 D。

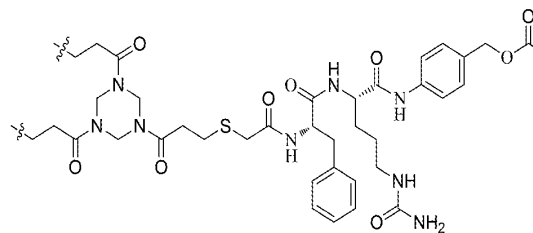
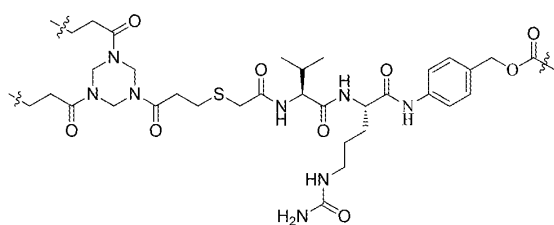
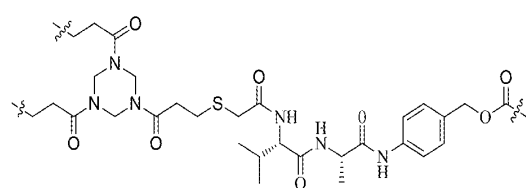
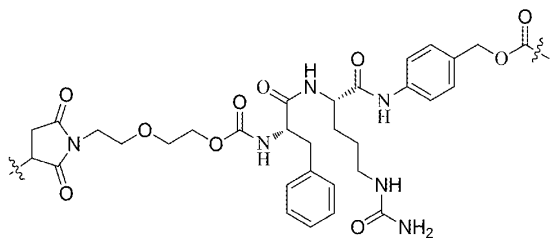
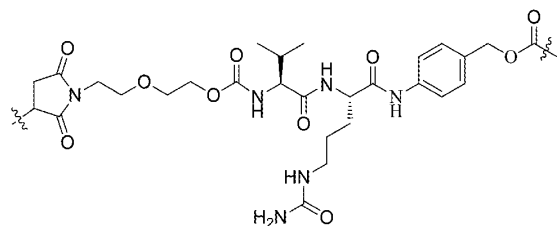
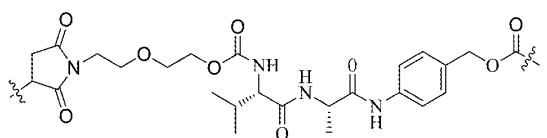
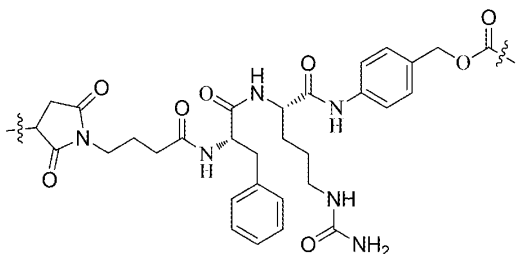
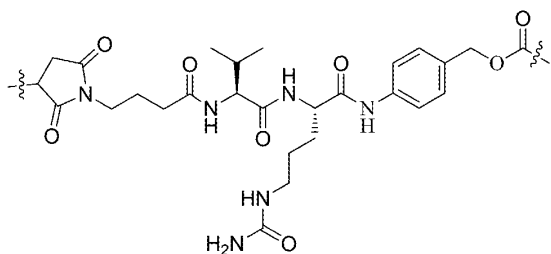
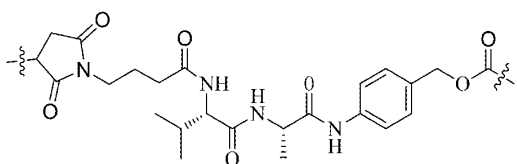
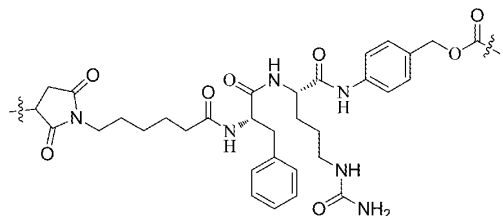
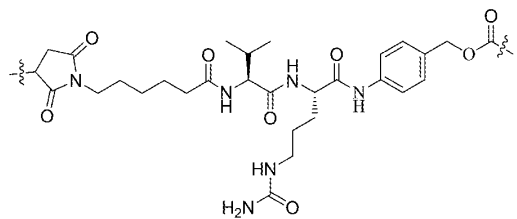
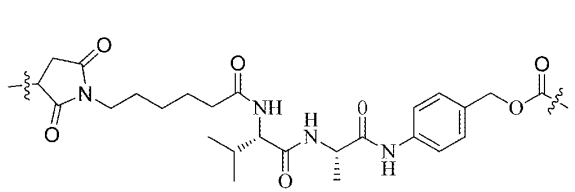
[19] 进一步的，所述的 L 与抗体 Ab 上氨基残基或巯基残基共价连接；优选的，所述 L 与抗体 Ab 上的巯基残基共价连接；更优选的，所述 L 与抗体 Ab 上的链间二硫键打开后形成的巯基残基共价连接。

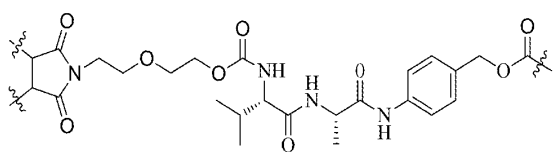
10 [20] 进一步的，所述的 L 为可裂解连接子和不可裂解连接子。

[21] 更进一步的，所述的可裂解连接子包括肽单元，所述的肽单元包含 2-20 个氨基酸，优选的所述的肽单元选自由-缬氨酸-瓜氨酸-(-Val-Cit-)、-甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸-(-Gly-Gly-Phe-Gly-)、-缬氨酸-丙氨酸-(-Val-Ala-)、-缬氨酸-赖氨酸-(-Val-Lys-)、-缬氨酸-精氨酸-(-Val-Arg-)、-苯丙氨酸-瓜氨酸-(-Phe-Cit-)、-苯丙氨酸-赖氨酸-(-Phe-Lys-)、-苯丙氨酸-精氨酸-(-Phe-Arg-)及它们的组合。

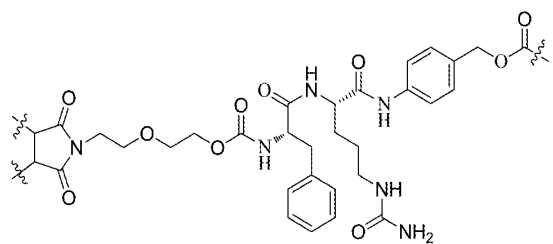
[22] 进一步的，前述任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述的 L 包括现有的连接子结构（专利公开号为 CN110997010A 的中国发明专利说明书第 7-10 页）：



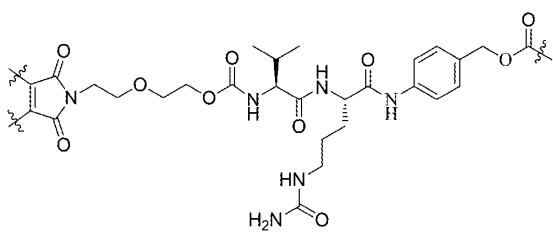




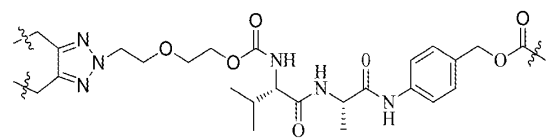
,



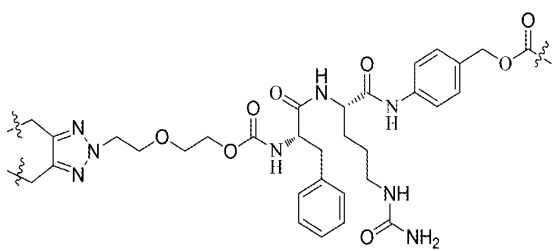
,



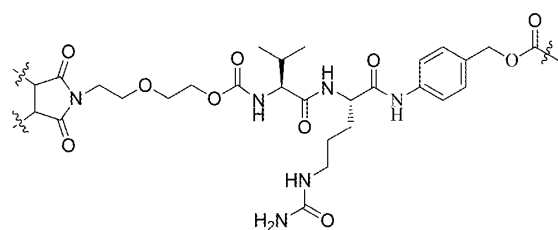
,



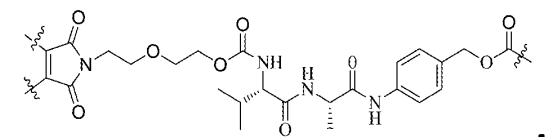
,



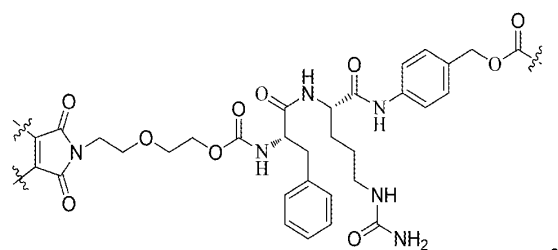
,



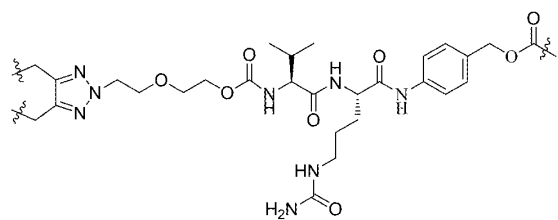
,



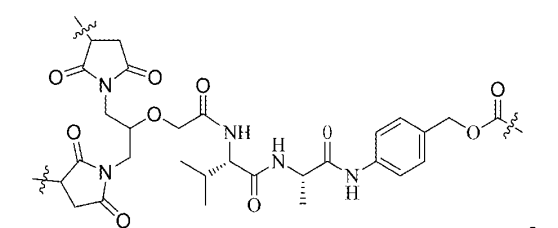
,



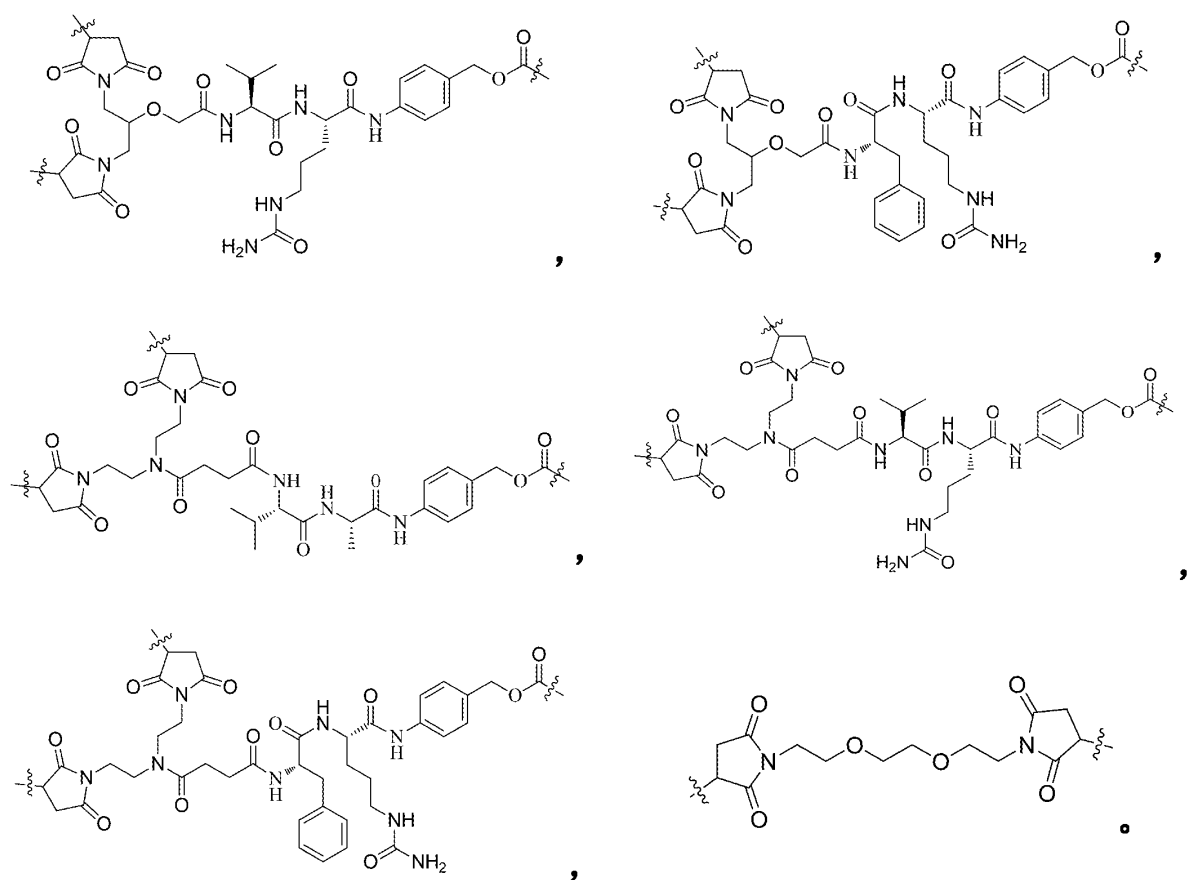
,



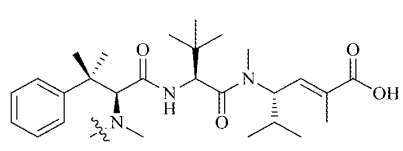
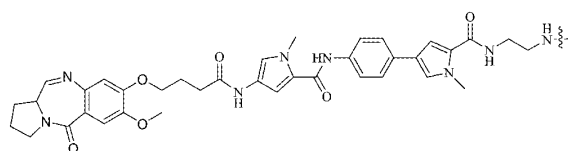
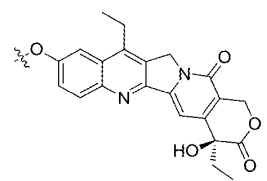
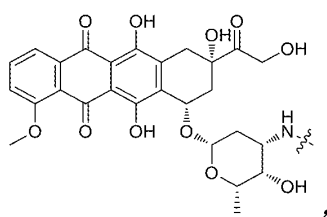
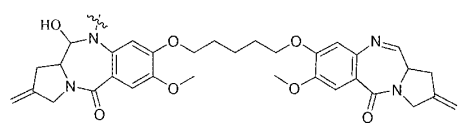
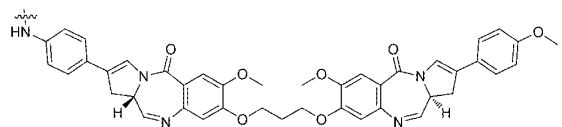
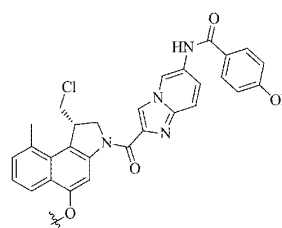
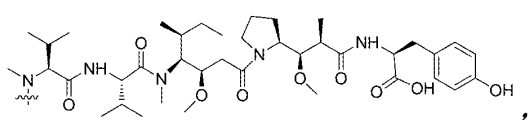
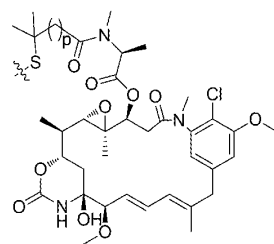
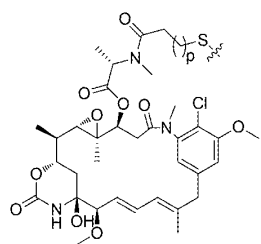
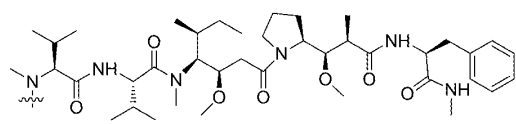
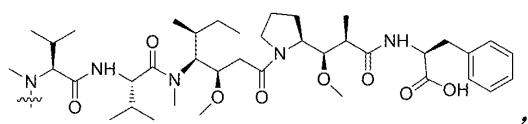
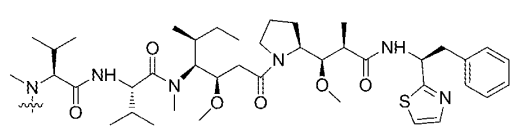
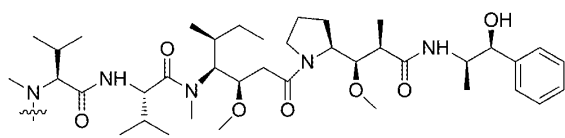
,

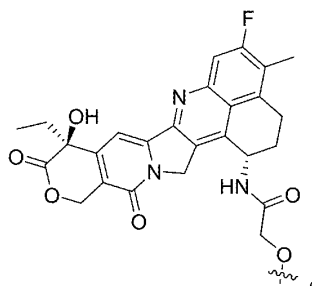
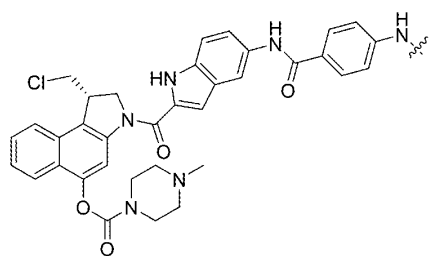
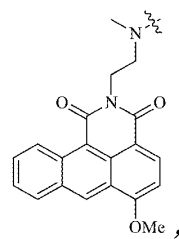
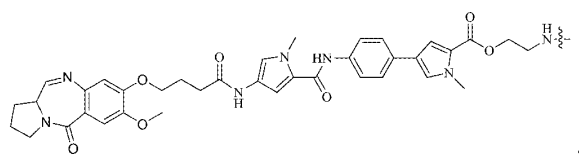
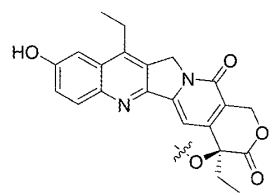
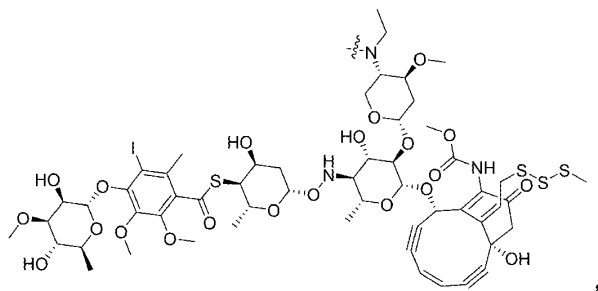
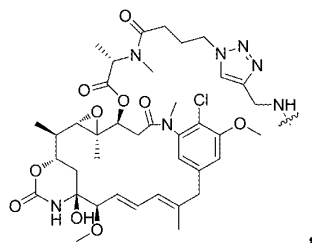
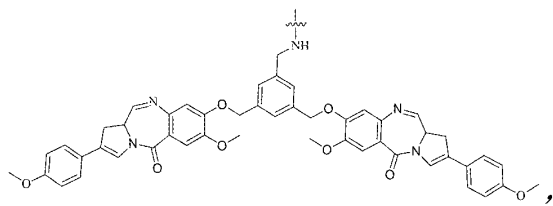


,

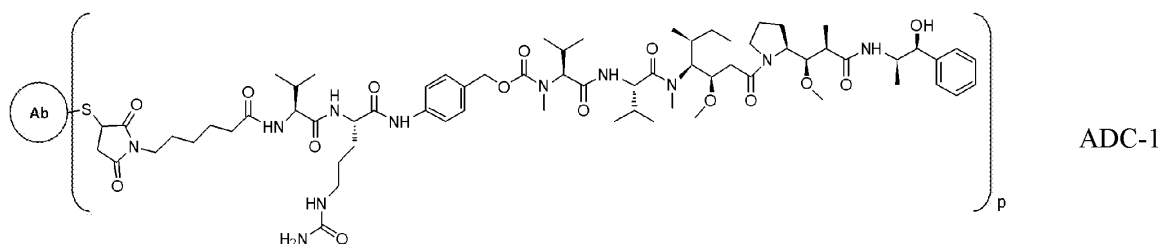


[23] 进一步的, 所述的活性药物单元 D 为细胞毒分子、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎症药物或治疗传染性疾病的药物; 优选的, 所述细胞毒分子包括但不限于微管蛋白抑制剂或 DNA 损伤剂, 所述微管蛋白抑制剂包括但不限于海兔毒素 (dolastatin) 及奥瑞他汀 (auristatin) 类细胞毒分子, 美登素 (maytansine) 类细胞毒分子; 所述 DNA 损伤剂包括但不限于卡奇霉素类 (calicheamicin)、倍癌霉素 (duocarmycin) 类、安曲霉素类衍生物 PBD、喜树碱 (camptothecins) 及喜树碱类衍生物、SN-38; 更优选的, 所述奥瑞他汀 (auristatin) 类细胞素分子包括但不限于 MMAE 或 MMAF 或它们的衍生物, 所述美登素类细胞毒分子包括但不限于 DM1、DM4 或它们的衍生物。更进一步的, 所述的活性药物单元 D 包含现有的用于 ADC 中的活性药物单元 (专利公开号为 CN110997010A 的中国发明专利说明书第 12-14 页):



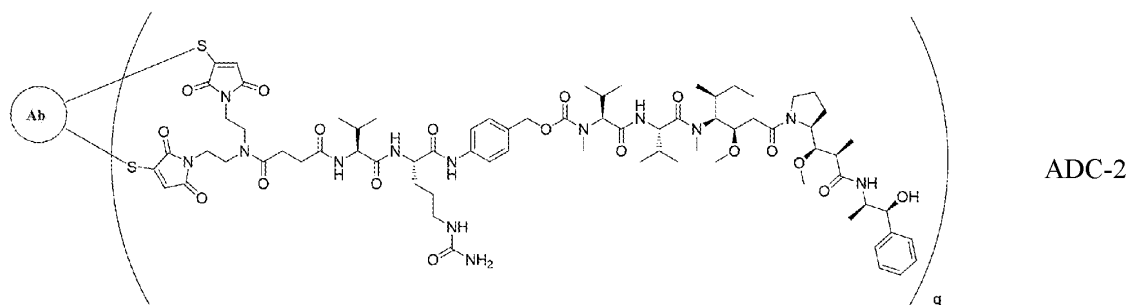


[24] 在一些优选的实施例中，本发明提供了如下结构的抗体药物偶联物（即 Ab--Mc-Val-Cit-PAB-MMAE）：



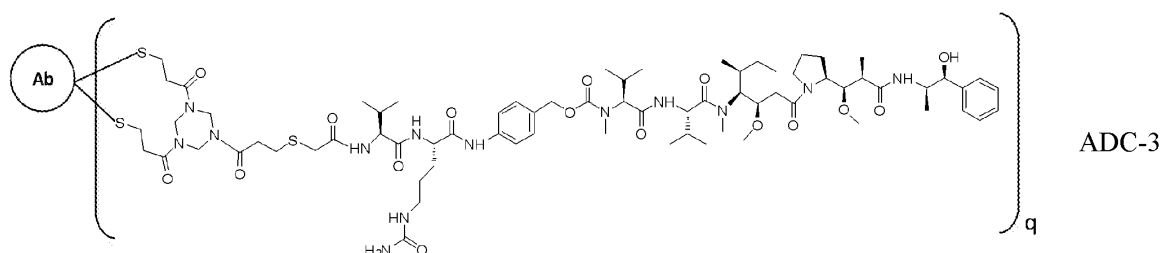
其中， p 为选自 1、2、3、4、5、6、7、8 的整数。

[25] 在另一些优选的实施例中,本发明提供了如下结构的抗体药物偶联物(即 Ab-D07-Val-Cit-PAB-MMAE):



其中, q 为选自 1、2、3、4 的整数。

[26] 在另一些优选的实施例中,本发明提供了如下结构的抗体药物偶联物 (即 Ab--PY-Val-Cit-MMAE) :



其中, q 为选自 1、2、3、4 的整数。

[27] 本发明还提供了一种分离的多核苷酸,其编码前述任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

[28] 本发明还提供了一种分离的多核苷酸的组合, 其包括: 编码前述任一项所述抗体或其抗原结合片段之重链的多核苷酸和编码前述任一项所述抗体或其抗原结合片段之轻链的多核苷酸。

[29] 本发明还提供了一种核酸构建体，其包含前述所述的多核苷酸。

[30] 进一步的，所述核酸构建体为载体。

[31] 本发明还提供了一种宿主细胞，其包含前述所述的核酸构建体或载体。

5 [32] 进一步的，所述的宿主细胞是原核细胞、真核细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、大肠杆菌细胞或 CHO 细胞、NS0 细胞、Sp2/0 细胞、BHK 细胞。

[33] 本发明还提供了一种药物组合物，包含前述任一项所述的抗体或其抗原结合片段和/或抗体药物偶联物，以及药学上可接受的载体。

10 [34] 本发明还提供了一种制备抗 Claudin18.2 抗体的方法，其包括在适合表达编码抗 Claudin18.2 抗体或抗原结合片段的载体的条件下培养前述所述的宿主细胞，并且回收所述抗体或片段。

[35] 前述任一项所述的抗体或其抗原结合片段、抗体药物偶联物、多核苷酸、多核苷酸组合、核酸构建体、载体、或药物组合物在制备用于治疗或
15 预防癌症的药物中的用途，其中所述癌症为实体瘤；进一步的，所述实体瘤包括胃癌、胰腺癌。

附图说明

[36] 图 1 为抗 Claudin18.2 鼠源抗体 CLN-03-3A7、CLN-03-4E5、CLN-03-6H2 给药后动物肿瘤体积变化曲线图；

20 [37] 图 2 为抗 Claudin18.2 鼠源抗体 CLN-03-3A7、CLN-03-4E5、CLN-03-6H2 给药后动物体重变化曲线图；

[38] 图 3 为嵌合抗体 CLN-03-4E5-01、CLN-03-6H2-01 及 IMAB362 亲和力检测对比图；

[39] 图 4A 显示了在胃癌模型 KATOIII 中 CLN-03-6H2-01 和 IMAB362 的内吞效率对比图；
25

[40] 图 4B 显示了在胰腺癌模型 AsPC-1 中 CLN-03-6H2-01 和 IMAB362 的内吞效率对比图；

[41] 图 4C 显示了在肺癌模型 A549 中 CLN-03-6H2-01 和 IMAB362 的内吞效率对比图；

30 [42] 图 5 为流式细胞法检测 RGCLN18.2 及

RGCLN18.2-PY-Val-Cit-PAB-MMAE、
RGCLN18.2-MC-Val-Cit-PAB-MMAE、
RGCLN18.2-D07-Val-Cit-PAB-MMAE、IMAB362-MC-Val-Cit-MMAE 的
内吞效果对比图；

5 [43] 图 6 为 RGCLN18.2-MC-Val-Cit-PAB-MMAE、
IMAB362-MC-Val-Cit-PAB-MMAE 及 PBS 给药后动物体重变化曲线图；

[44] 图 7 为 RGCLN18.2-MC-Val-Cit-PAB-MMAE、
IMAB362-MC-Val-Cit-PAB-MMAE 及 PBS 给药后荷瘤体积变化曲线图。

具体实施方式

10 [定义]

[45] 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相同含义。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。

15 [46] 在本发明中，抗体可变域的互补决定区(CDR)测定或编号方法包括本领域熟知的 IMGT、Kabat、Chothia、AbM 以及 Contact 法。

[47] 对本发明来说，两种核酸或者氨基酸序列间的“一致性”、“同一性”或“相似性”是指，在最佳比对(最优比对)后所获得的、待比较的两序列之间相同核苷酸或相同氨基酸残基的百分数，该百分数是纯粹统计学的并且两种序列间的差异随机分布并覆盖其全长。两种核酸或者氨基酸序列之间的序列比较通常是在以最优方式使它们匹配以后，通过比较这些序列而进行，所述比较能够通过区段或者通过“比较窗”实施。除了能够手工实施外，用于比较序列的最优比对，还能够通过 Smith 和 Waterman(1981)[Ad.App.Math.2: 482] 的局部同源性算法、通过 Neddleman 和 Wunsch 的(1970)[J.Mol.Biol.48: 443]局部同源性算法、通过 Pearson 和 Lipman 的(1988)[Proc. Natl.Acad.Sci.USA 85: 2444]相似性搜索方法、通过使用这些算法的计算机软件实施(GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575Science Dr., Madison, WI, 或者通过 BLAST N or BLAST P 比较软件)。

20
25
30

[48] 本文所使用的“抗体”以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）；本文所使用的

“抗原结合片段”是指抗体片段由其来源抗体的重或轻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,优选至少等于其来源抗体亲和力的 1/100,在更优选方式中至少等于 1/10。这种功能片段将包含最少 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。包括(特别是)Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、dAb、Fd、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、二价单链抗体,其含有至少一个足以使得特异性抗原结合于该多肽的免疫球蛋白片段。上述片段可经合成、或酶法、或通过对完整免疫球蛋白的化学切割而制备,或通过重组 DNA 技术进行遗传工程改造。其生产的方法在本领域中众所周知。一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。一条轻链包含一轻链可变区(缩写为 VL)和一轻链恒定区。该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)和经典补系统的第一成分(C1q)。嵌合或人源化抗体也涵盖在根据本发明的抗体中。

[49] 术语“人源化抗体”是指一种抗体,其包含来源于非人源抗体的 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,可以修饰骨架(称为 FR)区段的一些残基(文献 8: Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332: 323-327, 1988.)。通过本领域技术人员已知的技术可以制备根据本发明的人源化抗体或其片段(文献 9: Singer et al., J.Immun.150: 2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol.Genet.Eng.Rev., 10: 1-142, 1992; 或 Bebbington et al., Bio/Technology, 10: 169-175, 1992.)。

[50] 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发明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发明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发明嵌合抗体将是，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 Verhoeyn et al.(BioEssays, 8: 74, 1988)。

5 [51] 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性。

10 [52] 术语“分离地”核酸分子是从至少一个污染物核酸分子中鉴别与分离的核酸分子，在抗体核酸的天然来源中其一般地与该污染物核酸分子有联系。分离的核酸分子在其形式或环境上与其在自然界中发现时不同。分离的核酸分子因此不同于其在自然细胞中存在的核酸分子。然而，分离的核酸分子包括在通常表达抗体的细胞中加以包含的核酸分子，在该细胞中例如核酸分子位于与自然细胞不同的染色体位置上。

15 [53] 通常，为了制备单克隆抗体或其功能片段，尤其是鼠源的单克隆抗体或其功能片段，可以参考尤其描述在手册“Antibodies”中的技术(文献 10: 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)。

[实施例]

20 [54] 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，下面实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。

[55] 实施例 1 抗 Claudin18.2 鼠源抗体筛选及亲和力检测

25 [56] 以包含编码 Claudin18.2 第一胞外区蛋白的真核表达质粒的细胞作为免疫原免疫 Claudin18.2 敲除小鼠（来源于百奥赛图（北京）医药科技股份有限公司）。

30 [57] 共筛选获得鼠源抗体 22 株，分别是：CLN-40-3C8、CLN-07-4C3、CLN-39-8D11、CLN-39-1E1、CLN-03-6H2、CLN-03-4E5、CLN-03-1A8、CLN-03-4A11 、 CLN-07-5B10 、 CLN-07-5G11 、 CLN-03-3A7 、 CLN-03-4C11、CLN-38-4H3、CLN-03-4G7、CLN-39-1B6、CLN-39-3E7、CLN-03-1F5、CLN-38-8A1、CLN-39-7H7、CLN-03-6G10、CLN-40-6C9、CLN-07-5D9。

[58] 采用 FACS 的方法，检测获得的 22 株鼠源抗体同 Claudin18.2 的结合活性。将样品稀释至终浓度依次为：10 ug/mL、1 ug/mL、0.1 ug/mL、0.01 ug/mL、0.001 ug/mL，分别与 CHO-Claudin18.2 细胞 4℃反应 30min 后，离心弃上清，每孔加入 200μl PBS, 2000rpm, 5min，洗涤 2 遍后，每孔加入 50 μL 1: 100 倍稀释的 anti-mouse IgG₁-FITC 抗体（Abcam，货号 ab97264），4℃反应 30min，后重复洗涤步骤，洗涤一次，最后每孔加 200μL PBS，重悬，上机检测。检测结果如表 3 所示，多株抗体表现较好的结合活性。

表 3 抗 Claudin18.2 鼠源抗体亲和力检测结果

克隆号	细胞结合活性 EC50	
	ug/mL	nM
CLN-40-3C8	0.5022	0.335
CLN-07-4C3	0.703	0.469
CLN-39-8D11	0.8661	0.557
CLN-39-1E1	0.8726	0.582
CLN-03-6H2	1.168	0.779
CLN-03-4E5	1.281	0.854
CLN-03-1A8	1.367	0.911
CLN-03-4A11	1.373	0.915
CLN-07-5B10	1.511	1.007
CLN-07-5G11	1.601	1.067
CLN-03-3A7	2.386	1.59
CLN-03-4C11	2.655	1.77
CLN-38-4H3	2.792	1.86
CLN-03-4G7	3.337	2.22
CLN-39-1B6	3.635	2.43
CLN-39-3E7	3.676	2.42

CLN-03-1F5	4.259	2.83
CLN-38-8A1	4.806	3.2
CLN-39-7H7	5.154	3.43
CLN-03-6G10	6.054	4.03
CLN-40-6C9	7.185	4.78
CLN-07-5D9	9.093	6.06

[59] 实施例 2 抗 Claudin18.2 鼠源抗体体内药效评价

[60] 选取 11 株亲和力较好的抗 Claudin18.2 鼠源抗体（CLN-40-3C8、CLN-07-4C3、CLN-39-8D11、CLN-39-1E1、CLN-03-6H2、CLN-03-4E5、CLN-03-1A8 、 CLN-03-4A11 、 CLN-07-5B10 、 CLN-07-5G11 、 CLN-03-3A7），通过胃癌 PDX 模型选出 CLN-03-3A7，CLN-03-4E5，CLN-03-6H2 具有治疗潜力，继而对上述 3 株抗体进行后续的体内药效评价。

[61] 将胃癌肿瘤接种于 B-NDG 小鼠（本小鼠模型由百奥赛图江苏基因生物技术有限公司提供）皮下，待肿瘤体积达到 150mm³时进行分组，每个实验组 5 只小鼠。分组后，分别将内吞和结合表现较优的鼠源抗体 CLN-03-3A7，CLN-03-4E5，CLN-03-6H2 按照每周两次 10mg/kg 的剂量注射入小鼠腹腔，每周两次监测小鼠的肿瘤生长情况（肿瘤体积=0.5*长径*短径²）。具体结果如图 1 和图 2 所示，实验结果显示了 Claudin18.2 鼠源抗体对肿瘤有明显的抑制作用，并且抗体安全性良好，小鼠的体重没有发生明显变化，且三株鼠源抗体的抑肿瘤活性大小为 CLN-03-6H2>CLN-03-4E5>CLN-03-3A7。

[62] 实施例 3 嵌合抗体制备及亲和力检测

[63] 对 CLN-03-4E5 和 CLN-03-6H2 两株鼠源抗体分别进行嵌合抗体改造后获得 CLN-03-4E5-01，CLN-03-6H2-01 嵌合抗体。比较 CLN-03-4E5-01，CLN-03-6H2-01 和 IMAB362(人鼠嵌合单抗，claudiximab)的亲和力。结果可见(如表 4 和图 3 所示)，CLN-03-4E5-01，CLN-03-6H2-01 和 IMAB362 均表现出良好的亲和活性，且本发明提供的 CLN-03-4E5-01，CLN-03-6H2-01 两株嵌合抗体的结合活性均优于 IMAB362。

表 4 嵌合抗体与 IMAB362 亲和力 EC₅₀ 值

名称	EC ₅₀ 值(μ g/ml)
CLN-03-4E5-01	0.4475
CLN-03-6H2-01	0.4103
IMAB362	0.475

[64] 实施例 4 嵌合抗体内吞效率检测

[65] 对 CLN-03-6H2-01 嵌合抗体和 IMAB362(人鼠嵌合单抗, claudiximab) 的内吞效率进行了检测和比较, 按照 promega PHAb 抗体染料标记试剂盒 (Promega G9841) 说明书标记纯化的嵌合抗体, 抗体标记前浓度为 2mg/mL。将标记好的抗体与胃癌模型 KATOIII (ATCC), 胰腺癌模型 AsPC-1 (ATCC), 肺癌模型 A549 (ATCC) 细胞按照一定的浓度梯度, 于 37 °C 孵育。时间梯度设置为: 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 浓度梯度设定为: 0.1nM, 1nM, 10nM。每个采样点结束后采用细胞流式仪检测荧光强度。实验结果(参见图 4A、图 4B 和图 4C)显示嵌合抗体 CLN-03-6H2-01 在不同肿瘤细胞系上的内吞效应均优于 IMAB362, 其中图 4A 显示了在胃癌模型 KATOIII 中 CLN-03-6H2-01 和 IMAB362 的内吞效率对比, 图 4B 显示了在胰腺癌模型 AsPC-1 中 CLN-03-6H2-01 和 IMAB362 的内吞效率对比, 图 4C 显示了在肺癌模型 A549 中 CLN-03-6H2-01 和 IMAB362 的内吞效率对比。

[66] 实施例 5 嵌合抗体 CLN-03-6H2-01 的人源化改造

[67] 通过移植轻链或重链 CDR 到免疫球蛋白轻链或重链框架区对嵌合抗体 CLN-03-6H2-01 进行人源化改造。嵌合抗体 CLN-03-6H2-01 抗体轻链和重链的 CDR 用 Kabat 系统确定。通过对抗体可变区数据库比对, 确定人 IgG1 框架区。设计并合成了不同的人源化 Clandin 18.2 抗体的轻链可变区序列和不同的人源化 Clandin 18.2 抗体的重链可变区序列。将人源化 Clandin 18.2 抗体轻链可变区与人 kappa 恒定区通过 PCR 融合, 得到人源化 Clandin 18.2 轻链全长; 将人源化 Clandin 18.2 重链可变区与 IgG1 恒定区用 PCR 方法融合, 得到人源化 Clandin 18.2 重链全长。不同轻重链组合并表达, 采用流式 (FACS) 的方法检测纯化后的多株人源化抗体的亲和力 (见表 5), 选择具有最佳亲和力的 H-1 号抗体 (命名为 RGCLN18.2 抗体) 进行测序。

表 5 嵌合抗体 CLN-03-6H2-01 人源化改造抗体亲和力比较

人源化抗体序号	EC50(ug/mL)
H-1	0.1656
H-2	0.2443
H-3	0.3006
H-4	0.3120
H-5	0.3969
H-6	0.3971
H-7	0.4884
H-8	0.5953
H-9	0.8415
H-10	0.8469
H-11	1.009
H-12	1.122
H-13	1.541
H-14	1.636
H-15	1.940
CLN-03-6H2-01	0.462

[68] 表 6 示出了 RGCLN18.2 抗体轻链和重链的 CDR 氨基酸序列(Kabat 编号)。

表 6 RGCLN18.2 抗体重链和轻链的氨基酸序列 (Kabat 编号)

重链	CDR1	SEQ ID NO:5	NYLIE
	CDR2	SEQ ID NO:10	LINPGSGGTNYNEKFKG
	CDR3	SEQ ID NO:15	GGYYGNSFAY
轻链	CDR1	SEQ ID NO:20	KSSQSLLNSGNQKNYLT
	CDR2	SEQ ID NO:25	WASTRES

	CDR3	SEQ ID NO:30	QNAYYYPYT
--	------	--------------	-----------

[69] **RGCLN18.2 抗体重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) :**

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYAFT NYLIEWVRQA PGQGLEWMGL INPGSGGTNY 60
NEKFKGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARGG YGNSFAYWG QGTLVTVSS 119

[70] **RGCLN18.2 抗体轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:2) :**

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYLQKPGQSP QLLIYWASTR 60
ESGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQNAYYY PYTFGGGTKV EIK 113

[71] **RGCLN18.2 抗体的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:33) :**

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYAFT NYLIEWVRQA PGQGLEWMGL INPGSGGTNY 60
NEKFKGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARGG YGNSFAYWG QGTLVTVSSA 120
STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTWSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG 180
LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP 240
SVFLFPPKPK DTLNISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS 300
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIETISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM 360
TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ 420
QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK 449

[72] **RGCLN18.2 抗体的轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:34) :**

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYLQKPGQSP QLLIYWASTR 60
ESGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQNAYYY PYTFGGGTKV EIKRTVAAPS 120
VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKSTYS 180
LSSTLTLSKA DYKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC 220

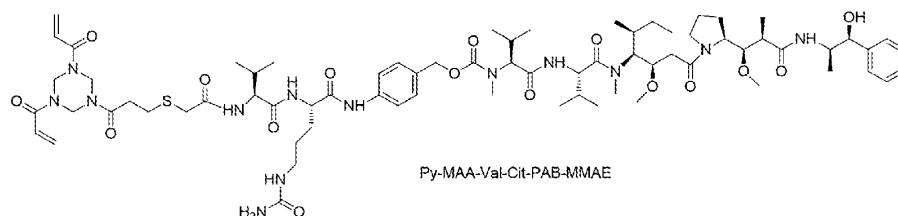
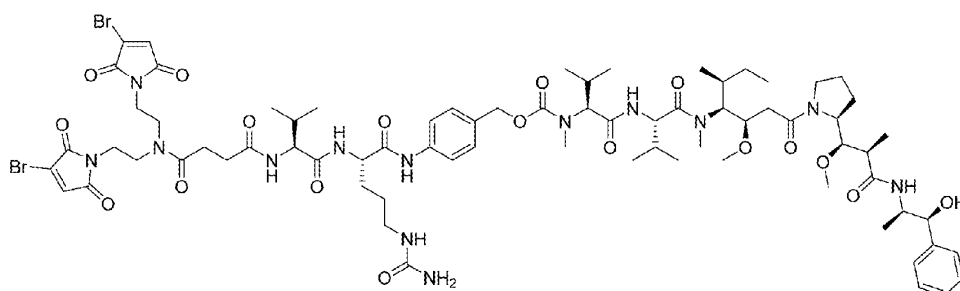
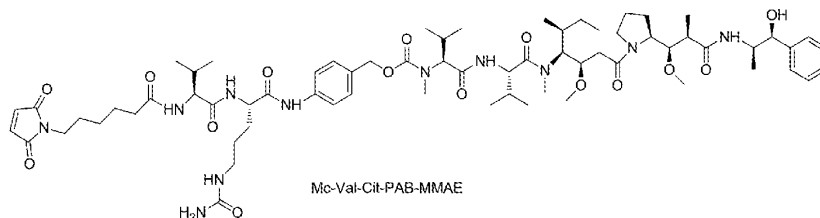
5 [73] **实施例 6 抗体药物偶联物 (ADC) 的制备**

[74] **抗体药物偶联物 (ADC) 的制备采用通用的偶联方法：用纯化水分别配制还原剂和保护剂如下：1~20 mM TCEP (Tris-2-carboxyethyl-phosphine)、1~20 mM DTPA (Diethylene triamine pentacetate acid)母液，还原剂用量根据所需偶联率不同可在一定浓度范围内添加，与一定浓度单克隆抗体（如：5~30 mg/mL）按照一定体积比（1:1）混合，TCEP 与抗体的终浓度摩尔比 0.5~6.0:1，于 25℃搅拌反应 1h。TCEP 还原后的抗体可直接进行偶联。**

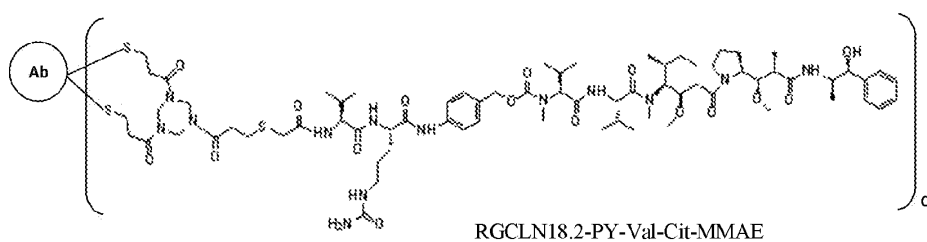
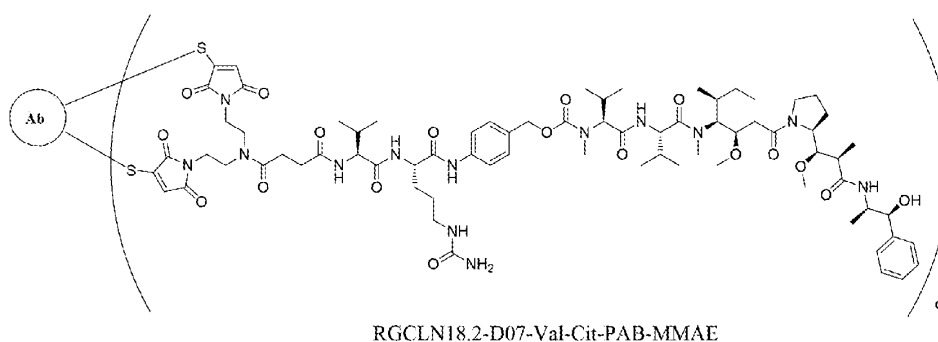
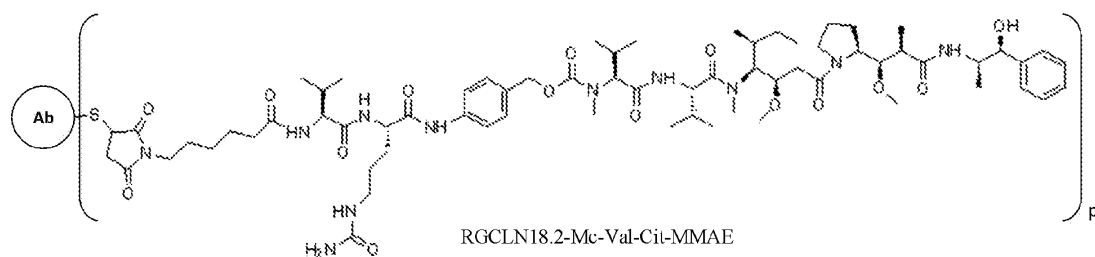
10

[75] 配制一定浓度 (5mM) 连接子-活性药物单元化合物溶于 25% 的 DMSO (dimethyl sulfoxide, 二甲亚砜), 按照药物与巯基的摩尔比 0.3~2.8:1 缓慢加药, 于 25°C 搅拌反应 1-4h。反应结束后, 用 PBS 缓冲液离心超滤 3 次, 纯化去除残余未反应药物以及 DMSO 等游离小分子, 并且利用 SDS-PAGE 电泳和疏水高效液相 (HIC-HPLC) 法检测偶联情况。

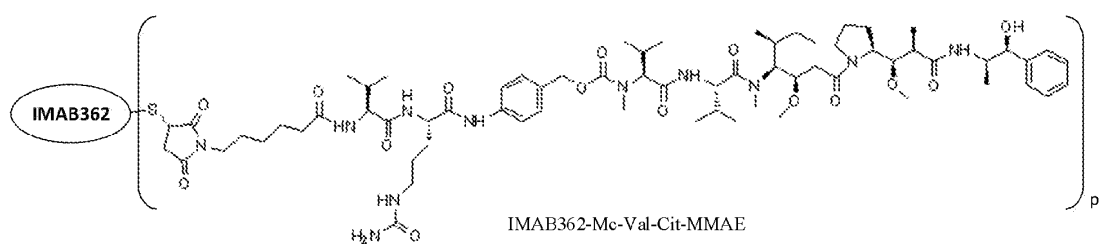
[76] 本实施例采用的连接子-活性药物单元化合物为 MC-Val-Cit-PAB-MMAE、D07-Val-Cit-PAB-MMAE 和 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE, 其结构式分别如下所示 (合成方法分别参见专利申请 CN108853514A (说明书第 14 页), CN111433188A (说明书第 53 页), WO2019223579A1 (说明书第 25-27 页))。



[77] 利用上述方法制备了如下 ADC (p 为选自 1、2、3、4、5、6、7、8 的整数, q 为选自 1、2、3、4 的整数, Ab 为本发明提供的 RGCLN18.2 抗体), 这些 ADC 的平均 DAR 为 3.5-4.5。



5 及



实施例 7 抗体药物偶联物的细胞内吞实验

[78] 将人胃癌细胞 NCI-N87 细胞系每孔约 1×10^5 个细胞重悬于 6 孔板中。
 将 RGCLN18.2 、 RGCLN18.2-PY-Val-Cit-PAB-MMAE 、
 RGCLN18.2-MC-Val-Cit-PAB-MMAE 、
 RGCLN18.2-D07-Val-Cit-PAB-MMAE 分别与 pHAb 胺反应性染料缓合，

然后用细胞培养基稀释至 10 μg/ml。将 100 μl RGCLN18.2 及 ADC 的染料复合物加入到细胞中，在指示时间（0 小时、1 小时、3 小时、5 小时、21 小时和 24 小时）下于 37℃温育。通过流式细胞仪测量 RGCLN18.2 及 ADC 的内吞效果。结果如图 5 所示，从内吞实验结果来看，发现 RGCLN18.2-PY-Val-Cit-PAB-MMAE、RGCLN18.2-MC-Val-Cit-PAB-MMAE、RGCLN18.2-D07-Val-Cit-PAB-MMAE ADC 在 24h 时的内吞率均为 98%左右。结果表明 RGCLN18.2 ADC 在人胃癌细胞 NCI-N87 细胞中有非常好的内吞效果。

[79] 实施例 8 抗体药物偶联物的体外细胞评价

[80] 将人胃癌细胞 NCI-N87 细胞株悬液以 100 μL/孔、5000 个/孔的密度加到 96 孔板中，置于水饱和的 37℃的 CO₂ 培养箱培养过夜。将抗体药物偶联物（RGCLN18.2-PY-Val-Cit-PAB-MMAE、RGCLN18.2-D07-Val-Cit-PAB-MMAE、RGCLN18.2-MC-Val-Cit-PAB-MMAE、IMAB362-MC-Val-Cit-MMAE）浓度进行梯度稀释并加到含有细胞的 96 孔板中，100 μL/孔。继续置于 37℃培养箱中培养 72 小时。酶标仪读取 450nm 处 OD 值，抑制率计算公式为：IR%=(OD 空白-OD 药物)×100/OD 空白。由曲线拟合软件 Softmax Pro7.0.3 Gxp 计算得 IC₅₀ 值，结果见表 7 所示。从以上实验数据体外药效试验来看，发现 RGCLN18.2-PY-Val-Cit-PAB-MMAE、RGCLN18.2-MC-Val-Cit-PAB-MMAE、RGCLN18.2-D07-Val-Cit-PAB-MMAE ADC 的增值抑制效果均优于 IMAB362-MC-Val-Cit-MMAE。

表 7 抗体药物偶联物的体外细胞 IC₅₀ 值、最大抑制率结果

ADC	DAR	IC ₅₀ (ng/ml)	抑制率 (%)
RGCLN18.2-PY-Val-Cit-PAB-MMAE	4.1	10.51	54.5
RGCLN18.2-D07-Val-Cit-PAB-MMAE	3.84	4.94	54.3
RGCLN18.2-MC-Val-Cit-PAB-MMAE	4.03	6.23	53.08
IMAB362-MC-Val-Cit-PAB-MMAE	4.22	501	52.27

[81] 实施例 9 抗体药物偶联的 PDX（人源肿瘤组织来源移植瘤模型）实验

[81] 将人胰腺癌组织清洗后切成小块，用套针接种于裸鼠背部右侧肩胛处，待肿瘤生长至 100~300mm³后将动物随机分组，对照组及实验组给

药情况如表 8 所示。

表 8 PDX 实验对照组及实验组给药情况

受试药物	死亡动物只数
PBS	给药后第 25 天死亡一只
IMAB362-MC-Val-Cit-PAB-MMAE	第 14、18、53 天各死亡一只
RGCLN18.2-MC-Val-Cit-PAB-MMAE	无死亡

[82] 实验结果如图 6、图 7 所示，其中图 6 给出了对照组及实验组动物体重变化曲线，图 7 给出了对照组及实验组动物荷瘤体积变化曲线，结果显示，RGCLN18.2-MC-Val-Cit-PAB-MMAE 在人胰腺癌 PDX 模型中的抑肿瘤药效强于 IMAB362-MC-Val-Cit-PAB-MMAE。

[83] 以上描述地仅是优选实施方案，其只作为示例而不限制实施本发明所必需特征的组合。所提供的标题并不意指限制本发明的多种实施方案。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。

[84] 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。不脱离本发明的范围和精神，本发明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式描述了本发明，但是应该理解所要求保护的本发明不应该被不适当地局限于这些具体实施方式。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发明的所描述的模式的各种变体意在包括在随附的权利要求的范围内。

权 利 要 求 书

1.一种抗 Claudin18.2 抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区的 CDR 和/或所述轻链可变区的 CDR 与如下序列限定的抗体具有相同的 CDR 序列或在如下序列限定的抗体的 CDR 上进行 1-2 个氨基酸替换, 所述序列限定的抗体为:

(1) 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 所示; 和/或

(2) 轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:2 所示。

2.根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中:

(1)重链可变区 CDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO:3、4、5、6 或 7 所示或对 SEQ ID NO:3、4、5、6 或 7 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; CDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO:8、9、10、11 或 12 所示或对 SEQ ID NO:8、9、10、11 或 12 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; CDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO:13、14、15、16 或 17 所示或对 SEQ ID NO:13、14、15、16 或 17 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列;

(2)轻链可变区 CDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO:18、19、20、21 或 22 所示或对 SEQ ID NO:18、19、20、21 或 22 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; CDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO:23、24、25、26 或 27 所示或对 SEQ ID NO:23、24、25、26 或 27 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; CDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO:28、29、30、31 或 32 所示或对 SEQ ID NO:28、29、30、31 或 32 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列。

3.根据权利要求 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中,

(1)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:3、8、13 或对 SEQ ID NO:3、8、13 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; 和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:18、23、28 或对 SEQ ID NO:18、23、28 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列;

(2)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:4、9、14 或对 SEQ ID NO:4、9、14 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; 和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:19、24、29 或对 SEQ ID NO:19、24、29 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列;

(3)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:5、10、15 或对 SEQ ID NO:5、10、15 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; 和/或轻链

可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:20、25、30 或对 SEQ ID NO:20、25、30 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；

5 (4)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:6、11、16 或对 SEQ ID NO:6、11、16 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:21、26、31 或对 SEQ ID NO:21、26、31 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；

10 (5)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:7、12、17 或对 SEQ ID NO:7、12、17 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:22、27、32 或对 SEQ ID NO:22、27、32 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列。

4.根据权利要求 1-3 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于：

15 (1)重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，或与 SEQ ID NO:1 具有相同的 CDR 1-3 且与 SEQ ID NO:1 相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列；和/或

(2)轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，或与 SEQ ID NO:2 具有相同的 CDR 1-3 且与 SEQ ID NO:2 相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列。

5.根据权利要求 4 所述的抗体或其抗原结合片段，其中，

20 (1)重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:33 所示；和/或

(2)轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示。

25 6.根据权利要求 1 所述的抗体或抗原结合片段，所述的抗体或其功能性结合片段包括单克隆抗体、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、单链 Fv(scFv)、双特异性抗体、多特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体或包含抗体的抗原结合部分的融合蛋白；优选的，所述的抗体为人源化单克隆抗体。

7.根据权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其进一步包括人或鼠恒定区；优选的，所述恒定区选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。

30 8.一种抗体药物偶联物，其含有权利要求 1-7 任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

9.根据权利要求 8 所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述的抗体

药物偶联物结构如式(I)所示:



其中:

Ab 为权利要求 1-7 任一项所述的抗体或其抗原结合片段;

5 D 为活性药物单元;

L 为任一连接基团, 其分别与抗体或其抗原结合片段 Ab 及活性药物单元 D 共价连接;

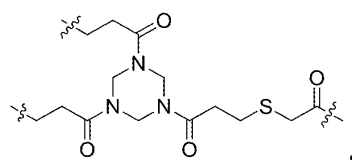
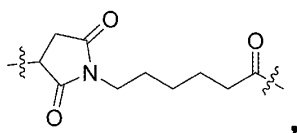
其中, 所述 Ab 上通过一个或多个连接基团 L 连接一个或多个活性药物单元 D。

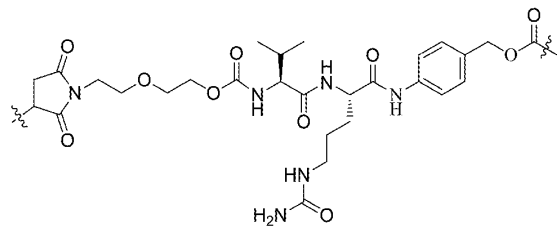
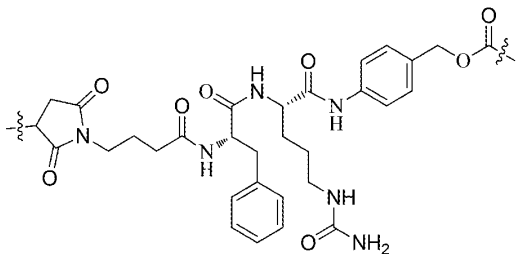
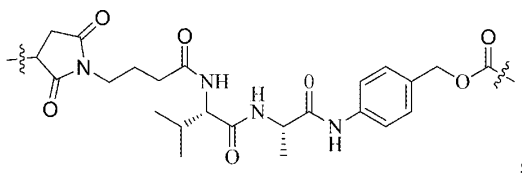
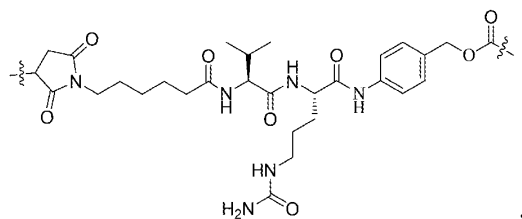
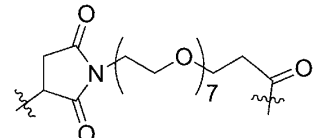
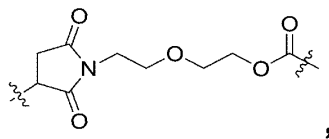
10 10. 根据权利要求 9 所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述 L 与所述 Ab 上氨基残基或巯基残基共价连接; 优选的, 所述 L 与所述 Ab 上的巯基残基共价连接; 更优选的, 所述 L 与所述 Ab 上的链间二硫键打开后形成的巯基残基共价连接。

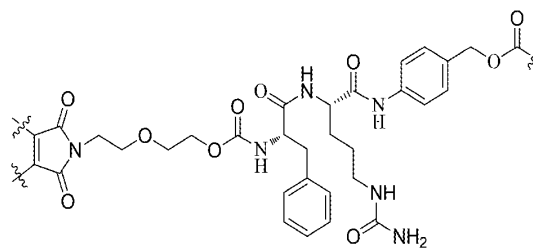
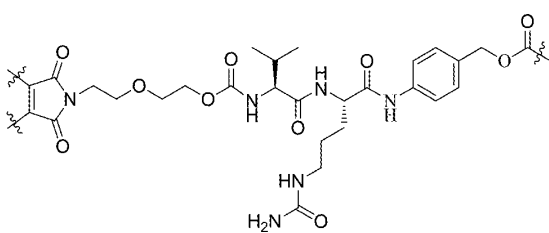
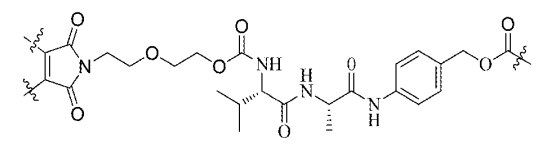
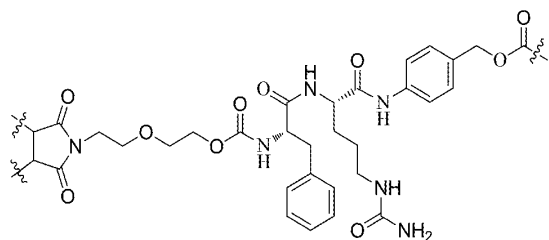
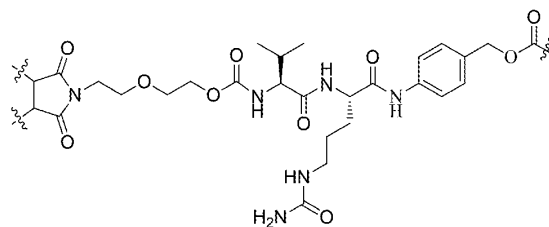
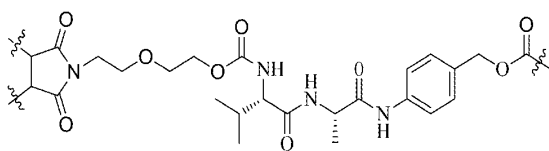
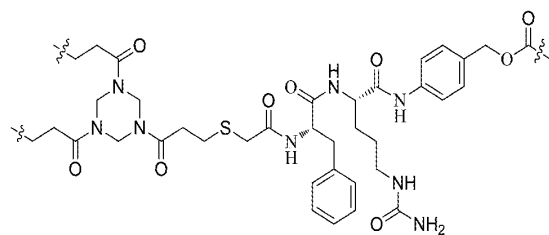
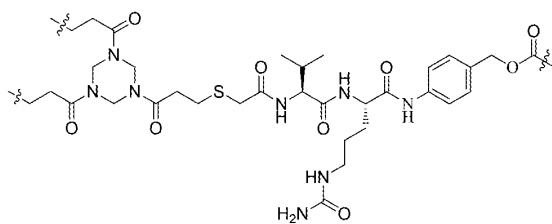
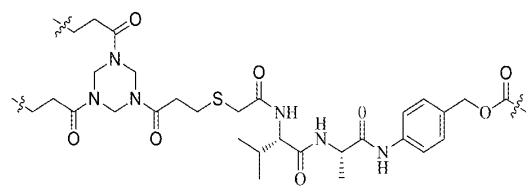
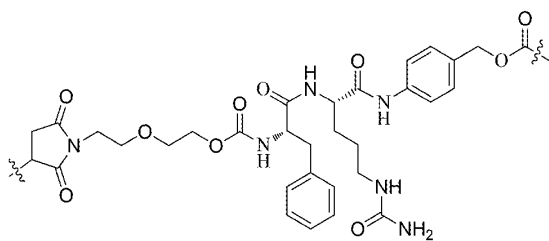
15 11. 根据权利要求 9 所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述 L 包括可裂解连接子和不可裂解连接子。

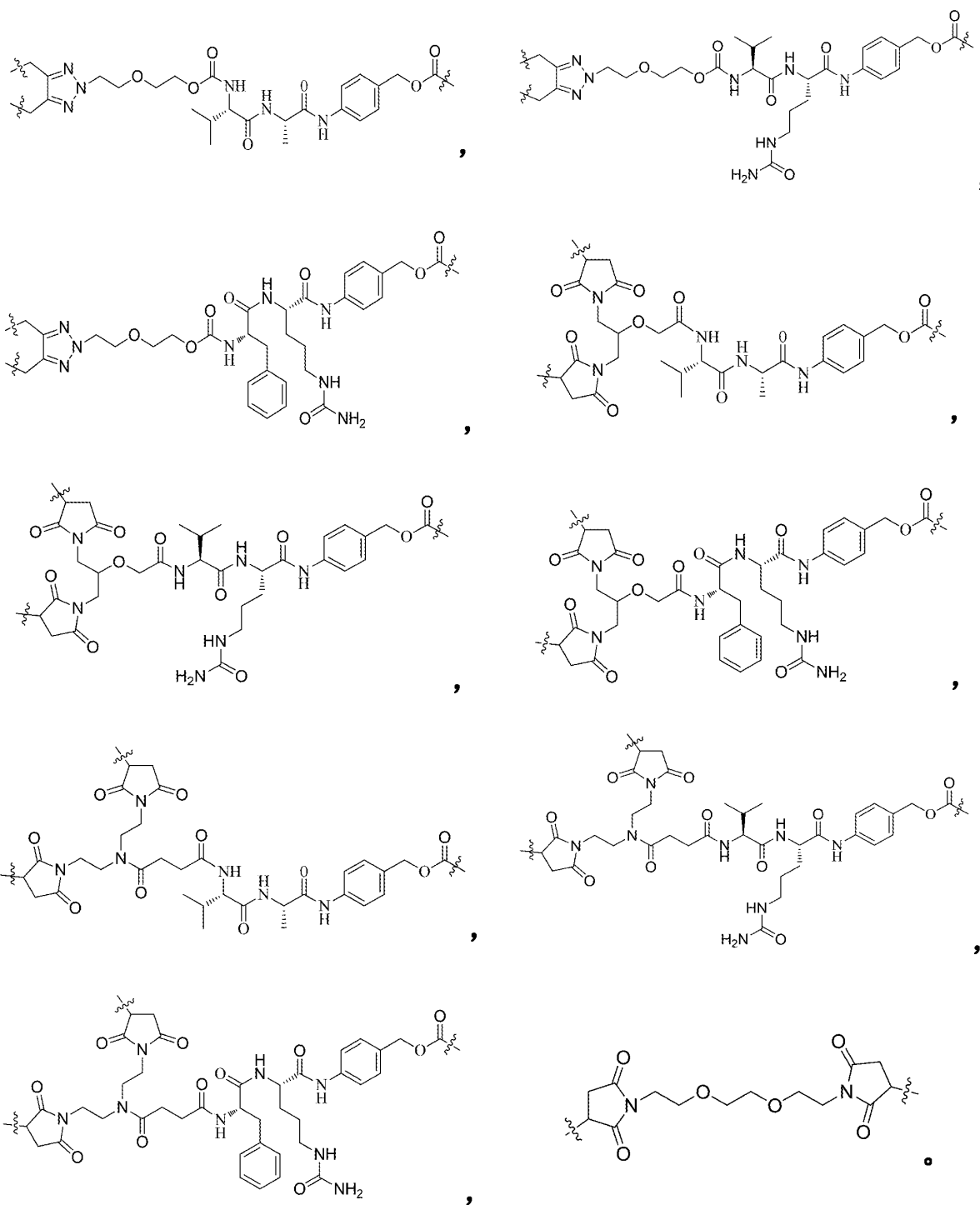
20 12. 根据权利要求 11 所述的抗体药物偶联物, 其特征在于: 所述的可裂解连接子包括肽单元, 所述的肽单元包含 2-20 个氨基酸, 优选的所述的肽单元选自自由-缬氨酸-瓜氨酸-(-Val-Cit-)、-甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸-(-Gly-Gly-Phe-Gly-)、-缬氨酸-丙氨酸-(-Val-Ala-)、-缬氨酸-赖氨酸-(-Val-Lys-)、-缬氨酸-精氨酸-(-Val-Arg-)、-苯丙氨酸-瓜氨酸-(-Phe-Cit-)、-苯丙氨酸-赖氨酸-(-Phe-Lys-)、-苯丙氨酸-精氨酸-(-Phe-Arg-)及它们的组合。

13. 根据权利要求 9-12 任一项所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述的 L 包括以下结构:





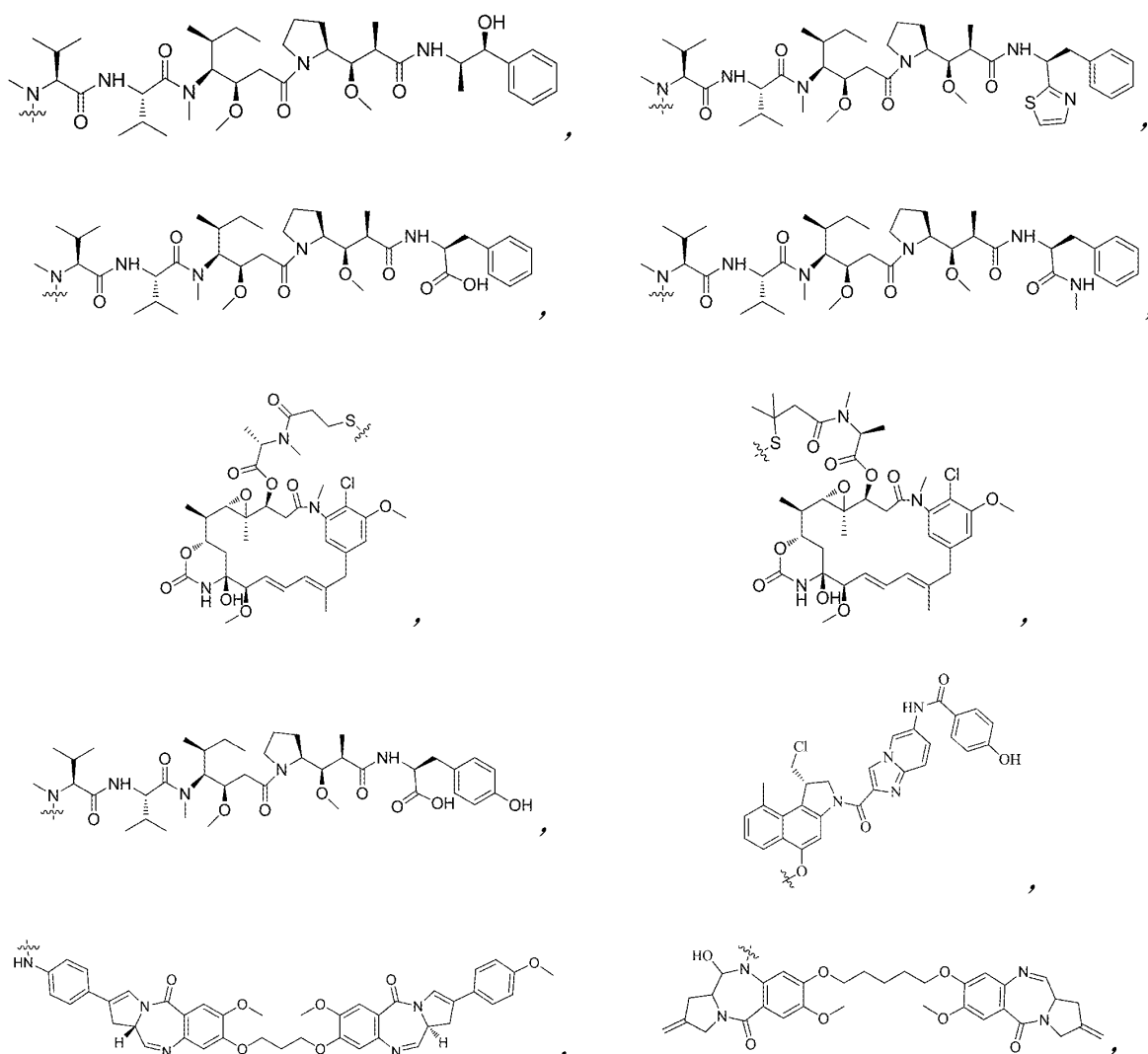


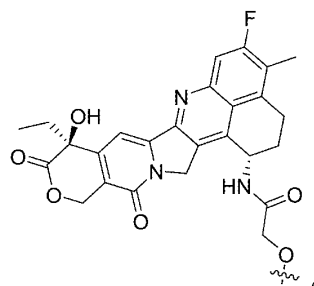
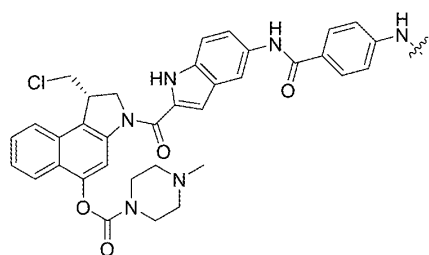
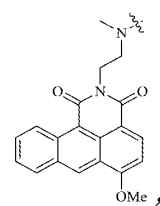
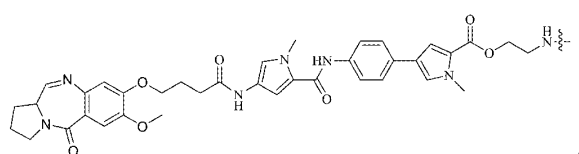
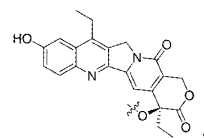
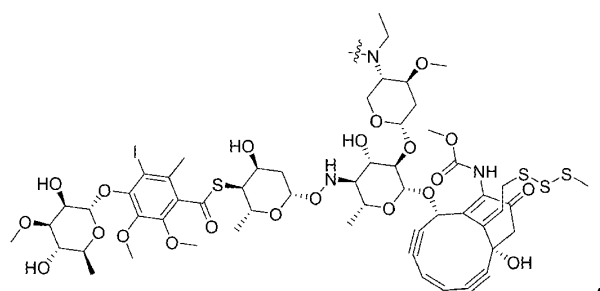
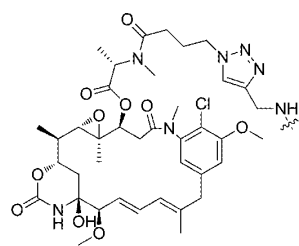
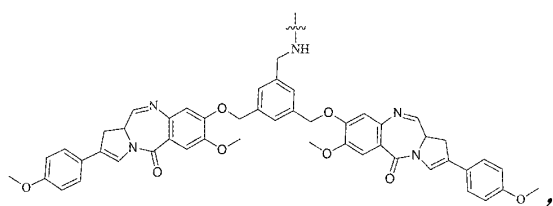
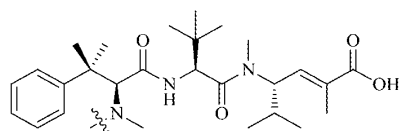
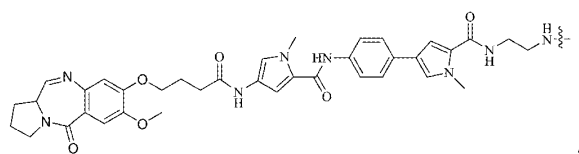
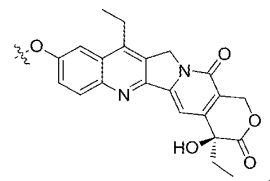
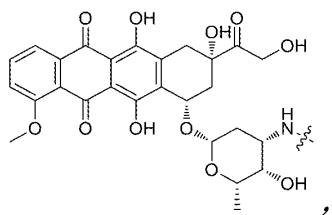


14. 根据权利要求9所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述的活性药物单元D为细胞毒分子、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎药物或治疗传染性疾病的药物；优选的，所述细胞毒分子包括但不限于微管蛋白抑制剂或DNA损伤

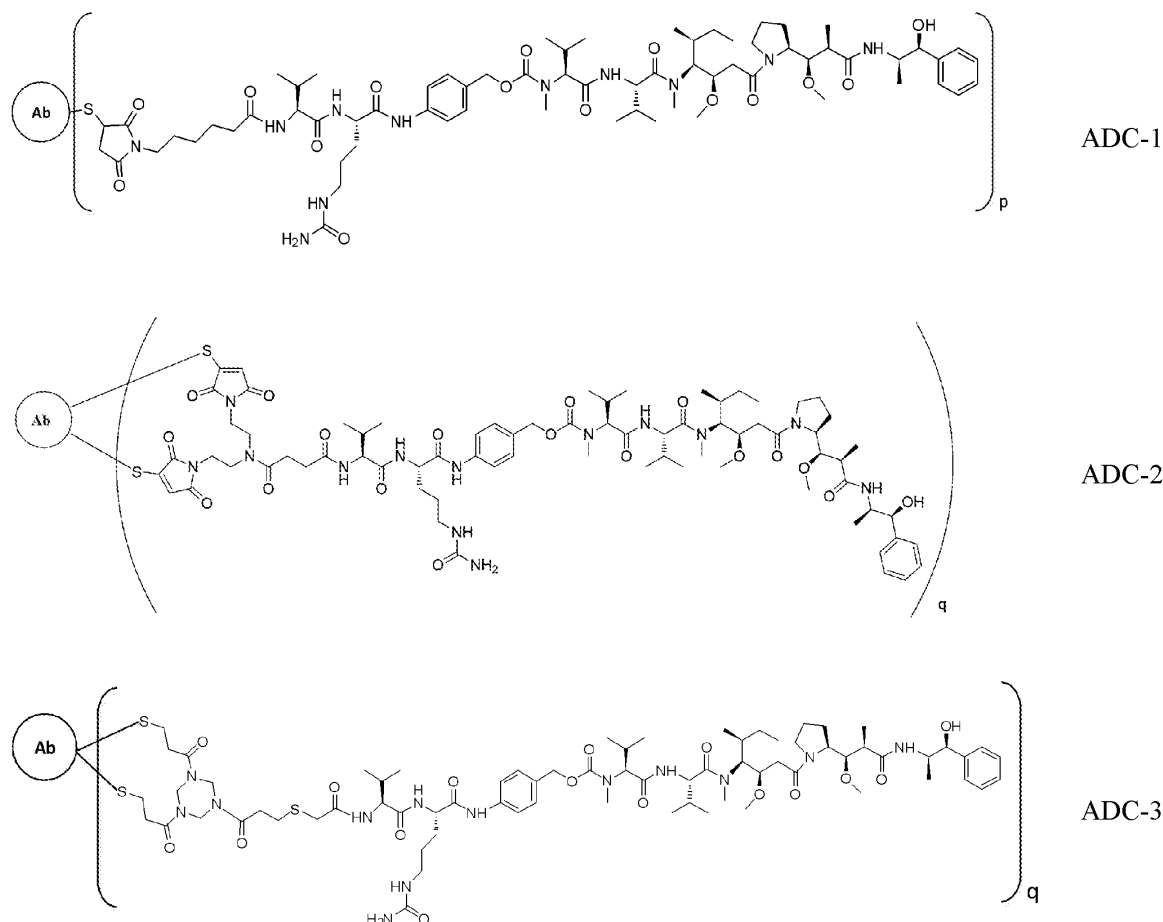
剂, 所述微管蛋白抑制剂包括但不限于海兔毒素(dolastatin)及奥瑞他汀(auristatin)类细胞毒分子, 美登素(maytansine)类细胞毒分子; 所述 DNA 损伤剂包括但不限于卡奇霉素类(calicheamicin)、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD、喜树碱(camptothecins)及喜树碱类衍生物、
5 SN-38; 更优选的, 所述奥瑞他汀(auristatin)类细胞素分子包括但不限于 MMAE 或 MMAF 或它们的衍生物, 所述美登素类细胞毒分子包括但不限于 DM1、DM4 或它们的衍生物。

15. 根据权利要求 9 所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述的活性药物单元 D 选自以下结构:





16. 根据权利要求 9 所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述抗体药物偶联物结构如下所示:



其中, p 为选自 1、2、3、4、5、6、7、8 的整数, q 为选自 1、2、3、4 的整数。

- 5 17. 分离的多核苷酸或其组合, 其编码权利要求 1-7 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
18. 一种核酸构建体, 其包含权利要求 17 的多核苷酸。
19. 权利要求 18 所述的核酸构建体, 所述核酸构建体为载体。
20. 一种宿主细胞, 其包含权利要求 18 或 19 中的核酸构建体。
- 10 21. 权利要求 20 所述的宿主细胞, 所述细胞是原核细胞、真核细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、大肠杆菌细胞或 CHO 细胞、NS0 细胞、Sp2/0 细胞、BHK 细胞。

22. 药物组合物, 包含权利要求 1-7 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段和/或权利要求 8 或 15 的抗体药物偶联物, 以及药学上可接受的载体。

5 23. 制备抗 Claudin18.2 抗体的方法, 其包括在适合表达编码抗 Claudin18.2 抗体或抗原结合片段的载体的条件下培养权利要求 20 或 21 所述的宿主细胞, 并且回收所述抗体或片段。

10 24. 权利要求 1-7 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 8-15 所述的抗体药物偶联物、权利要求 17 的多核苷酸或其组合、权利要求 18 的核酸构建体、权利要求 19 的载体、或权利要求 22 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。

25. 权利要求 24 所述的用途, 其中所述癌症为实体瘤; 进一步的, 所述实体瘤包括胃癌、胰腺癌。