

一种含抗体药物偶联物的药物组合物及其用途

本申请要求 2020 年 09 月 30 日提交的中国专利申请(202011061863.1)和 2021 年 09 月 13 日提交的中国专利申请 (CN202111069020.0) 的优先权。

技术领域

本披露属于药物制剂领域，具体涉及一种包含抗体药物偶联物的药物组合物，以及其作为抗癌药物的用途。

背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

密蛋白 18 (Claudin-18, CLDN18) 是一种在人类中由 Claudin18 基因编码的蛋白质，属于细胞紧密连接蛋白家族，可以控制层细胞之间的分子流动。Claudin 蛋白结构中包括四个跨膜区域、两个细胞外环（其 N 末端和 C 末端在胞浆内）。

Claudin-18 具有两个剪接变体，分别为 Claudin 18.1 和 Claudin 18.2，两者序列之间仅在第一个细胞外环有八个氨基酸的差异。Claudin 18.1 和 Claudin 18.2 的表达分布有所不同，Claudin 18.1 在正常肺的细胞中选择性表达，Claudin 18.2 在正常细胞中表达高度受限，但在多种肿瘤（胃癌、肺癌和胰腺癌等）中频繁异位激活和过表达。Claudin18.2 被认为是胃癌和其他癌症类型的潜在治疗靶点，此靶点的发现也为胃癌的治疗提供了一种新的选择。

抗体药物偶联物 (antibody drug conjugate, ADC) 将单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的化学接头化合物与具有生物活性的细胞毒素相连，充分利用了抗体对正常细胞和肿瘤细胞表面抗原结合的特异性和细胞毒性物质的高效性，同时又避免了前者疗效偏低和后者毒副作用过大等缺陷。这也就意味着，与以往传统的化疗药物相比，抗体药物偶联物能更精准地结合肿瘤细胞并降低将对正常细胞的影响。

目前已有靶向 Claudin18.2 的抗体及 ADC 药物的专利报道，如 WO2016166122 和 WO2016165762。

由于 ADC 具有比抗体更复杂的异质结构，因此，对于治疗目的 ADC 制剂提出了更大的挑战。

发明内容

本披露涉及含抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物的药物制剂及其用途。该制剂具有稳定性好，冻干形态好等优势。

本披露提供一种药物组合物，其包含抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物和缓冲剂，其中所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物中的抗 Claudin18.2 抗体包含重链可变区和

轻链可变区，其中：

i) 所述重链可变区与如 SEQ ID NO: 5 所示的重链可变区具有相同氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含与如 SEQ ID NO: 6 所示的轻链可变区具有相同氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

5 ii) 所述重链可变区与如 SEQ ID NO: 3 所示的重链可变区具有相同氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区与如 SEQ ID NO: 4 所示的轻链可变区具有相同氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

所述缓冲剂是组氨酸盐缓冲剂。

10 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲剂为组氨酸-醋酸盐缓冲剂。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 Claudin18.2 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

15 iii) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

iv) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

20 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 Claudin18.2 抗体是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 Claudin18.2 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：包含重链可变区和轻链可变区，其中：

25 (1) 所述重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示或与其有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，和所述轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示或与其有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性；

30 (2) 所述重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示或与其有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，和所述轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示或与其有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性；

35 (3) 所述重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示或与其有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，和所述轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示或与其有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性；或

(4) 所述重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示或与其有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性, 和所述轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示或与其有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性。

5 在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述抗 Claudin18.2 抗体为人源化抗体, 所述人源化抗体包含来自人抗体的框架区或其框架区变体, 所述框架区变体为在人抗体的轻链框架区和/或重链框架区上分别具有至多 10 个氨基酸的回复突变。

10 在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述框架区变体包含选自以下 (a) 或 (b) 所述的突变:

(a) 所述轻链可变区中包含任选自 22S、85I 和 87H 中的一个或多个氨基酸回复突变, 和/或所述重链可变区中包含任选自 48I、82T 和 69M 中的一个或多个氨基酸回复突变; 或

15 (b) 所述轻链可变区中包含选自任选自 4L 或 22S 中的一个或多个氨基酸回复突变, 和/或所述重链可变区中包含任选自 38K、40R、48I、66K、67A、69L、71L 和 73K 中的一个或多个氨基酸回复突变。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述框架区变体包含选自以下所述的突变:

20 (a-1) 所述轻链可变区中包含 22S、85I 和 87H 的氨基酸回复突变, 和所述重链可变区中包含 48I 和 82T 的氨基酸回复突变; 或

(b-1) 所述轻链可变区中包含 4L 的氨基酸回复突变;

其中, 所述重链可变区的 82T 中的 82 为 Kabat 规则的第 82A 位。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中抗 Claudin18.2 抗体包含如下任一所示的重链可变区和轻链可变区:

25 (vii) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 3 所示和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 4 所示;

(viii) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 24、25、26 或 27 所示和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 21、22 或 23 所示;

30 (ix) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 5 所示和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 6 所示; 或

(x) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 31、32、33 或 34 所示和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 28、29 或 30 所示;

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中抗 Claudin18.2 抗体包含如下任一所示的重链可变区和轻链可变区:

35 (xi) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 31 所示和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 29 所示; 或

(xii) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 26 所示和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 23 所示。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中抗 Claudin18.2 抗体包含抗体重链恒定区和轻链恒定区。

- 5 在一些实施方案中，所述重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恒定区及其常规变体，所述轻链恒定区选自人抗体 κ 和 λ 链恒定区及其常规变体。在一些实施方案中，所述抗体包含如 SEQ ID NO: 7 所示的重链恒定区和如 SEQ ID NO: 8 所示的轻链恒定区。

- 10 在一些实施方案中，所述抗体包含：与具有 SEQ ID NO: 35 或 42 所示氨基酸序列的重链具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的重链，和与具有 SEQ ID NO: 36 或 39 所示氨基酸序列的轻链有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的轻链；或与具有 SEQ ID NO: 37 或 49 所示氨基酸序列的重链具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的重链，
15 和与具有 SEQ ID NO: 38 或 46 所示氨基酸序列的轻链有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的轻链。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中抗 Claudin18.2 抗体包含如下任一所示的重链和轻链：

- 20 (c) 序列如 SEQ ID NO: 35 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 36 所示的轻链；

(d) 序列如 SEQ ID NO: 42、43、44 或 45 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 39、40 或 41 所示的轻链；

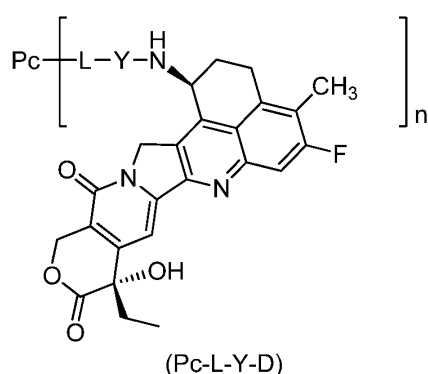
(e) 序列如 SEQ ID NO: 37 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 38 所示的轻链；或

- 25 (f) 序列如 SEQ ID NO: 49、50、51 或 52 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 46、47 或 48 所示的轻链。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中抗 Claudin18.2 抗体包含如下任一所示的重链和轻链：

- 30 SEQ ID NO: 44 所示的重链，和 SEQ ID NO: 41 所示的轻链；或
SEQ ID NO: 49 所示的重链，和 SEQ ID NO: 47 所示的轻链。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物具有如通式 (Pc-L-Y-D) 所示的结构：



其中：

Y 选自 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 、 $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$ 、 $-O-CR^1R^2-$ 、 $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 和 $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ；

- 5 R^a 和 R^b 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟烷基、环烷基和杂环基；
或者， R^a 和 R^b 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

R^1 选自卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基；

- 10 R^2 选自氢原子、卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基；

或者， R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

或者， R^a 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

m 为 0 至 4 的整数；

- 15 n 为 1 至 10， n 是小数或整数；

L 为接头单元；

Pc 为抗 Claudin18.2 抗体；

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中 n 是小数或整数，可以是 2 至 8、3 至 7、3.5 至 4.5、2、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9。

- 20 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物具有如通式 (Pc-L-Y-D) 所示的结构，

其中：

Y 为 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ；

R^a 和 R^b 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素或 C_{1-6} 烷基；

- 25 R^1 为卤代 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基；

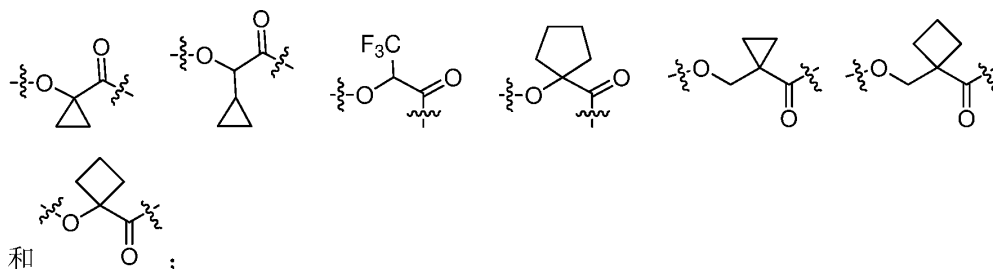
R^2 选自氢原子、卤代 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基；

或者， R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成 C_{3-6} 环烷基；

m 为 0 或 1。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 Claudin18.2

抗体药物偶联物具有如通式 (Pc-L-Y-D) 所示的结构, 其中 Y 选自:



其中 Y 的 O 端与接头单元 L 相连。

- 5 在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中接头单元 -L- 为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$,

L^1 选自 -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-W-C(O)-、 $-\text{CH}_2\text{-C(O)-NR}^3\text{-W-C(O)-}$ 或 $-\text{C(O)-W-C(O)-}$, 其中 W 选自 C_{1-8} 烷基、 C_{1-8} 烷基-环烷基或 1 至 8 个链原子的直链杂烷基, 所述杂烷基包含 1 至 3 个选自 N、O 或 S 的杂原子, 其中所述的 C_{1-8} 烷基、 C_{1-8} 烷基-环烷基或 1 至 8 个链原子的直链杂烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、 C_{1-6} 烷基、氯代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{3-6} 环烷基的一个或多个取代基所取代;

L^2 选自 $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{p^1}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)-}$ 、 $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{p^1}\text{CH}_2\text{C(O)-}$ 、 $-\text{S}(\text{CH}_2)_{p^1}\text{C(O)-}$ 或化学键, 其中 p^1 为 1 至 20 的整数;

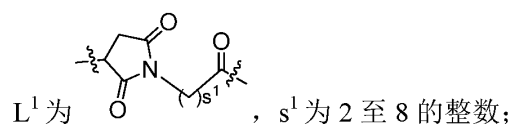
15 L^3 为由 2 至 7 个氨基酸构成的肽残基, 其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基, 并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、 C_{1-6} 烷基、氯代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{3-6} 环烷基中的一个或多个取代基所取代;

L^4 选自 $-\text{NR}^5(\text{CR}^6\text{R}^7)_t-$ 、 $-\text{C(O)NR}^5-$ 、 $-\text{C(O)NR}^5(\text{CH}_2)_t-$ 或化学键, 其中 t 为 1 至 20 6 的整数;

R^3 、 R^4 和 R^5 相同或不同, 且各自独立地选自氢原子、 C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 羟烷基;

R^6 和 R^7 相同或不同, 且各自独立地选自氢原子、卤素、 C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 羟烷基。

- 25 在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中接头单元 -L- 为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$,



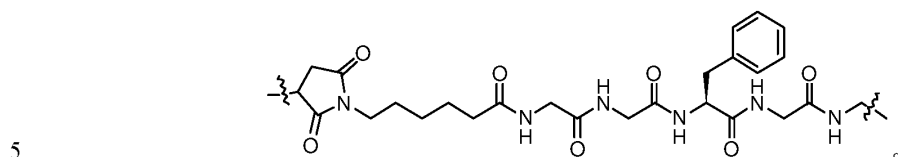
L^2 为化学键;

L^3 为四肽残基; 优选为 GGFG 的四肽残基 (SEQ ID No: 55);

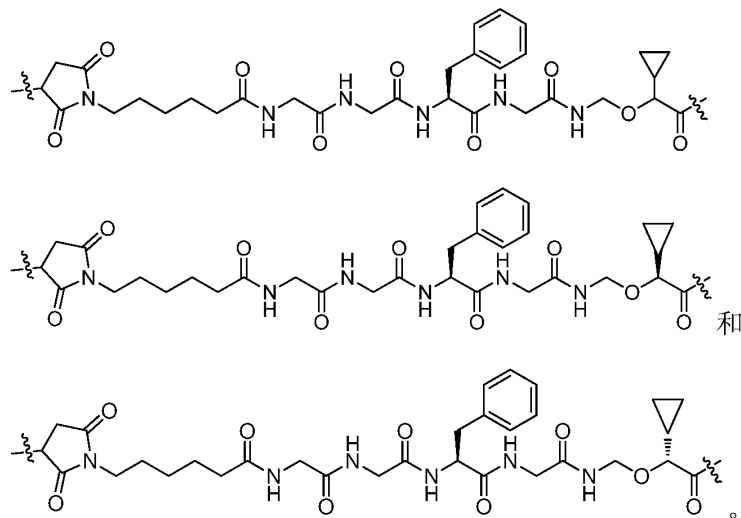
L^4 为 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$, R^5 、 R^6 或 R^7 相同或不同, 且各自独立地为氢原子或 C_{1-6} 烷基, t 为 1 或 2;

其中所述的 L^1 端与 Pc 相连, L^4 端与 Y 相连。

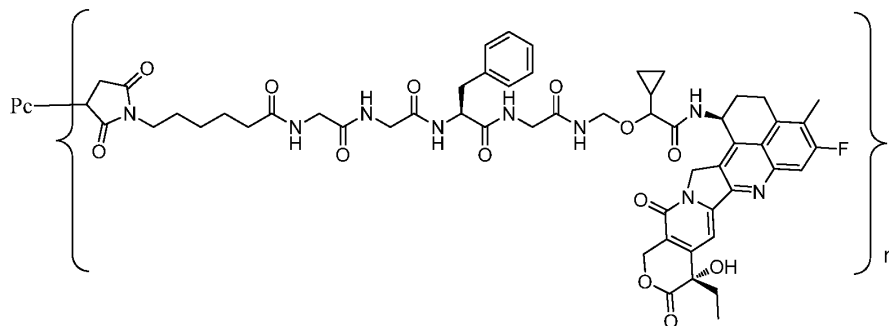
在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中 -L- 为:

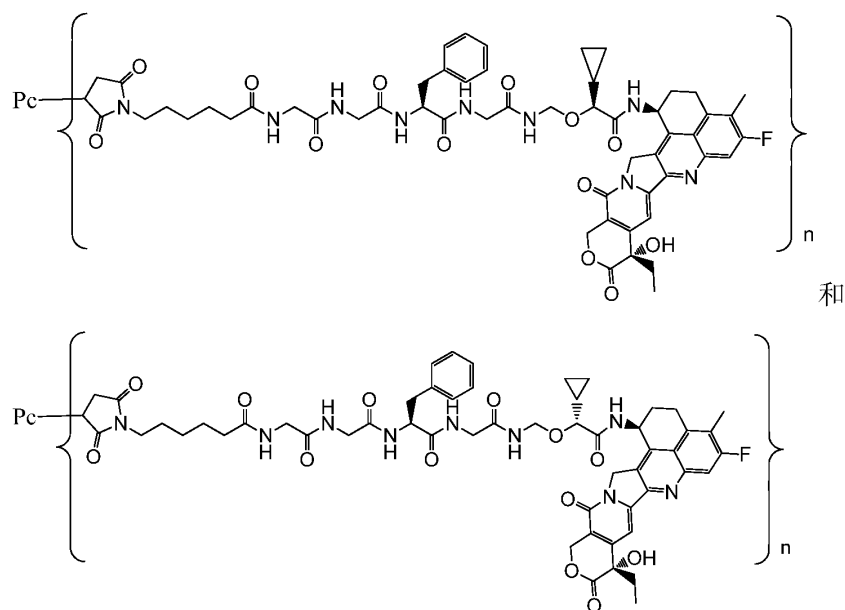


在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中 L-Y-任选自:



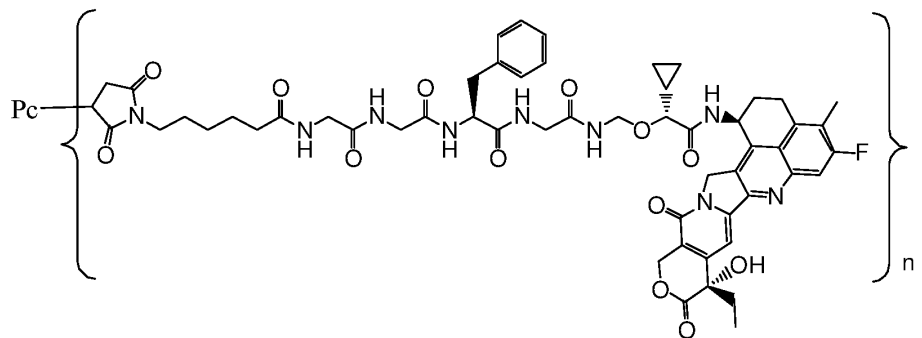
10 在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物选自如下任一所示的结构:





其中 Pc 和 n 如通式 (Pc-L-Y-D) 中所定义。

5 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物具有如下式所示的结构：



其中:

n 为 2 至 8, n 是小数或整数;

Pc 为抗 Claudin18.2 抗体。

10 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物还包含表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂选自聚山梨酯（如聚山梨酯 20、聚山梨酯 80）、聚羟亚烃、Triton、十二烷基磺酸钠、月桂基磺酸钠、辛基糖甙钠、月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、

15 柯卡酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲基胺、棕榈酰胺基丙基-二甲基胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺、甲基可可酰基钠、

甲基油基牛磺酸钠、聚乙二醇、聚丙二醇、乙烯与丙烯二醇的共聚物等。

在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80 或聚山梨酯 20。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80。

5 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述表面活性剂浓度为 0.05 mg/mL 至 0.5 mg/mL 或 0.1 mg/mL 至 0.2 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.15mg/mL、0.18mg/mL、0.19 mg/mL、0.2 mg/mL、0.21 mg/mL、0.22 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.2 mg/mL。

10 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述组合物还包含糖。在一些实施方案中，所述糖选自常规组合物 $(CH_2O)_n$ 及其衍生物，包括单糖、二糖、三糖、多糖、糖醇、还原性糖、非还原性糖等等。所述的糖可选自葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、果糖、麦芽糖、右旋糖苷、甘油、赤藻糖醇、丙三醇、阿拉伯糖醇、sylitol、山梨糖醇、甘露醇、密里二糖、松三糖、蜜三糖、甘露三糖、
15 水苏糖、麦芽糖、乳果糖、麦芽酮糖、山梨醇、麦芽糖醇、乳糖醇、异-麦芽酮糖等。在一些实施方案中，所述糖选自蔗糖、甘露醇和海藻糖。在一些实施方案中，所述糖为蔗糖。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述糖浓度为 20 mg/mL 至 100 mg/mL 或 40 mg/mL 至 80 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖浓度为
20 20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL、50 mg/mL、60 mg/mL、70 mg/mL、80 mg/mL、90 mg/mL 或 100 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖浓度为 40 mg/mL。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗体药物偶联物浓度为以蛋白(即抗体)浓度计 1 mg/mL 至 100 mg/mL 或以蛋白浓度计 10 mg/mL 至 30 mg/mL。在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物浓度为以蛋白浓度计
25 5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL、50 mg/mL、60 mg/mL、70 mg/mL、80 mg/mL、90 mg/mL 或 100 mg/mL。在一些实施方案中，所述体药物偶联物浓度为以蛋白浓度计 20 mg/mL。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲剂的浓度为 5 mM 至 50 mM 或 10 mM 至 30 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为
30 5 mM、10 mM、15 mM、20mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM 或 50 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 30 mM。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物的 pH 为 5.0-6.5 或 5.0-5.5。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 或 6.5。在一些
35 实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.0-5.4。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.0-5.3。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 以蛋白浓度计 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物，(b) 0.1 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯，(c) 40 mg/mL 至 80 mg/mL 的糖，和 (d) 10 mM 至 30 mM 的组氨酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为约 5.0-5.5。

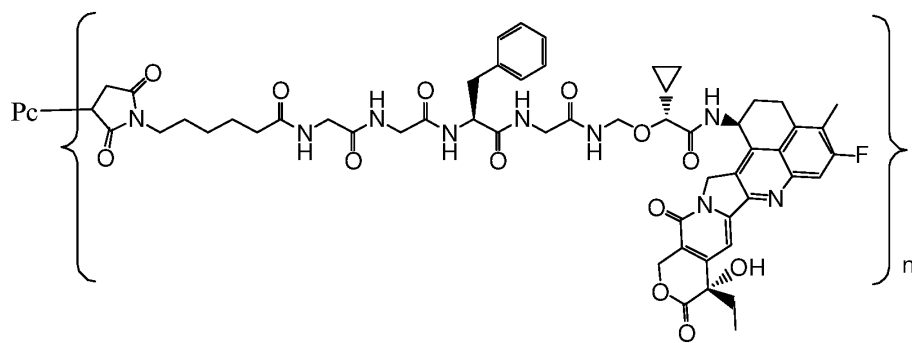
5 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 以蛋白浓度计 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物，(b) 0.1 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 40 mg/mL 至 80 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 至 30 mM 的组氨酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为约 5.0-5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

10 (a) 以蛋白浓度计 20 mg/mL 的所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物，(b) 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 40 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 30 mM 组氨酸-醋酸盐缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 5.0-5.3。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物具有如下式所示的结构：



15

其中：

n 为 2 至 8，n 是小数或整数；

Pc 为抗 Claudin18.2 抗体，其包含 SEQ ID NO: 49 所示的重链，和 SEQ ID NO: 47 所示的轻链；所述药物组合物含有以蛋白浓度计 20 mg/mL 的所述抗体药物偶联物；

20

所述药物组合物还包含以下组分：

0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80、40 mg/mL 的蔗糖和 30 mM 组氨酸-醋酸盐缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 5.0-5.3。

25 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述药物组合物是液体制剂。在一些实施方案中，所述液体制剂的溶剂是水。

本披露还提供一种含抗体药物偶联物的冻干制剂，其特征在于所述制剂复溶后可形成如上任一项所述的药物组合物。

本披露还提供一种的冻干制剂，其为如上任一项所述的药物组合物的冻干形式。

本披露还提供一种制备含抗体药物偶联物的冻干制剂的方法，其中包括将如上任一项所述的药物组合物进行冷冻干燥的步骤。

本披露还提供一种含抗体药物偶联物的冻干制剂，所述制剂通过将如上任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得。

5 在一些实施方案中，如上任一项所述冷冻干燥依次包括预冻、一次干燥和二次干燥的步骤。

在一些实施方案中，冻干程序如下所示：预冻，温度为 5°C；预冻，温度为-45°C；一次干燥，温度为-20°C，真空度为 20Pa；二次干燥的温度为 25°C，真空度为 1Pa。在一些实施方案中，冻干程序如下所示：预冻，温度为 5°C，时间 10 min；
10 预冻，温度为-45°C，时间 50 min；一次干燥，温度为-20°C，真空度为 20Pa，时间 120 min；二次干燥的温度为 25°C，真空度为 1Pa，时间 60 min。

在一些实施方案中，冻干制剂于 2-8°C 稳定至少 3 个月，至少 6 个月，至少 12 个月，至少 18 个月或至少 24 个月。在一些实施方案中，该冻干制剂于 40°C 稳定至少 7 天，至少 14 天或至少 28 天。

15 本披露还提供一种的冻干制剂，其为如上任一项所述的冻干制剂的复溶形式。

本披露还提供一种含抗体药物偶联物的复溶溶液，其特征在于所述复溶溶液是通过将如上任一项所述的冻干制剂经复溶制备获得。

在一些实施方案中，如上所述的复溶溶液包含如下组分：

(a) 以蛋白浓度计 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物，(b) 0.1 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯，(c) 40 mg/mL 至 80 mg/mL 的糖，和
20 (d) 10 mM 至 30 mM 的组氨酸盐缓冲剂；所述复溶溶液的 pH 为约 5.0-5.5。

在一些实施方案中，如上所述的复溶溶液包含如下组分：

(a) 以蛋白浓度计 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物，(b) 0.1 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 40 mg/mL 至 80 mg/mL 的蔗糖，
25 和 (d) 10 mM 至 30 mM 的组氨酸盐缓冲剂；所述复溶溶液的 pH 为约 5.0-5.5。

在一些实施方案中，如上所述的复溶溶液包含如下组分：

(a) 以蛋白浓度计 20 mg/mL 的所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物，(b) 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 40 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 30 mM 组氨酸-醋酸盐缓冲剂，
30 所述复溶溶液的 pH 为 5.0-5.3。

本披露还提供一种制品，其包括容器，该容器中装有如上任一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂或如上任一项所述的复溶溶液。

本披露还提供一种治疗肿瘤或癌症的方法，包括向受试者施用有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液、或如上任一项所述的制品。

35 在一些实施方案中，本披露还提供如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的制品在制备治疗肿瘤

或癌症的药物中的用途。

在一些实施方案中，本披露还提供用作药物的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的制品。

在一些实施方案中，所述肿瘤或癌症优选为头和颈鳞状细胞癌、头和颈癌、
5 脑癌、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、中枢神经系统癌、神经内分泌肿瘤、咽喉癌、鼻咽癌、食管癌、甲状腺癌、恶性胸膜间皮瘤、肺癌、乳腺癌、肝癌、肝细胞瘤、肝细胞癌、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、胃肠道癌、肠癌、结肠癌、结肠直肠癌、肾癌、透明细胞肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈
10 癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、皮肤癌、黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、骨癌、软骨肉瘤、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、骨髓异常增生综合征、库肯勃氏瘤、骨髓增生性肿瘤、鳞状细胞癌、尤因氏肉瘤、全身性轻链淀粉样变性和梅克尔细胞癌。

在一些实施方案中，所述淋巴瘤选自：何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤和淋巴浆细胞
15 性淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述肺癌选自：非小细胞肺癌和小细胞肺癌。

在一些实施方案中，所述白血病选自：慢性髓细胞样白血病、急性髓细胞样白血病、淋巴细胞白血病、成淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病和髓样细胞白血病。

20

附图说明

图 1：人源化抗体在细胞水平与人 Claudin18.2 的结合 FACS 检测结果。

图 2：人源化抗体的 NUGC4 细胞内吞实验。

图 3A 至图 3C：抗体在不同 Claudin18.2 表达程度的 NUGC4 细胞中 ADCC 效应检测。图 3A 为抗体在野生型 NUGC4 细胞（Claudin18.2 低表达）中的 ADCC 效应检测；图 3B 为抗体在 Claudin18.2 中等表达 NUGC4 细胞中的 ADCC 效应检测；图 3C 为抗体在 Claudin18.2 高表达 NUGC4 细胞中的 ADCC 效应检测。

图 4：本披露 ADC-1 的抑瘤实验结果。

图 5：本披露 ADC-2 的抑瘤实验结果。

30

具体实施方式

术语

为了更容易理解本披露，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本披露所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

35

“抗体药物偶联物（antibody drug conjugate, ADC）”是把抗体或者抗体片段通

过稳定的化学接头化合物与具有生物活性的细胞毒素或具有细胞杀伤活性的小分子药物相连，充分利用了抗体对肿瘤细胞特异或高表达抗原结合的特异性和细胞毒素的高效性，避免对正常细胞的毒副作用。与以往传统的化疗药物相比，抗体药物偶联物能精准地结合肿瘤细胞并降低将对正常细胞的影响。

5 “缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受 pH 变化的缓冲剂。将 pH 控制在适当范围中的缓冲剂的例子包括醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸盐、草酸盐、乳酸盐、磷酸盐、枸橼酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。

“组氨酸盐缓冲剂”是包含组氨酸根离子的缓冲剂。组氨酸盐缓冲剂的实例包括
10 组氨酸-盐酸盐，组氨酸-醋酸盐，组氨酸-磷酸盐，组氨酸-硫酸盐等缓冲剂；优选组氨酸-醋酸盐缓冲剂。组氨酸-醋酸盐缓冲剂是组氨酸与醋酸配制而成，组氨酸盐酸盐缓冲剂是组氨酸与盐酸配制而成。

“枸橼酸盐缓冲剂”是包括枸橼酸根离子的缓冲剂。枸橼酸盐缓冲剂的实例包括枸橼酸-枸橼酸钠、枸橼酸-枸橼酸钾、枸橼酸-枸橼酸钙、枸橼酸-枸橼酸镁等。优
15 选的枸橼酸盐缓冲剂是枸橼酸-枸橼酸钠。

“琥珀酸盐缓冲剂”是包括琥珀酸根离子的缓冲剂。琥珀酸盐缓冲剂的实例包括琥珀酸-琥珀酸钠、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙盐等。优选的琥珀酸盐缓冲剂是琥珀酸-琥珀酸钠。示例性的，所述的琥珀酸-琥珀酸钠可由琥珀酸与氢氧化钠配制而成，或由琥珀酸与琥珀酸钠配制而成。

20 “磷酸盐缓冲剂”是包括磷酸根离子的缓冲剂。磷酸盐缓冲剂的实例包括磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾、磷酸氢二钠-枸橼酸等。优选的磷酸盐缓冲剂是磷酸氢二钠-磷酸二氢钠。

“醋酸盐缓冲剂”是包括醋酸根离子的缓冲剂。醋酸盐缓冲剂的实例包括醋酸-醋酸钠、醋酸组氨酸盐、醋酸-醋酸钾、醋酸醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。优选的醋酸
25 盐缓冲剂是醋酸-醋酸钠。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述抗体药物偶联物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是保持活性成分的稳定性，促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

30 本披露中，“药物组合物”和“制剂”并不互相排斥。

本披露中所述药物组合物的溶液形式，若无特殊说明，其中的溶剂均为水。

“冻干制剂”表示液体或溶液形式的药物组合物或液体或溶液制剂经真空冷冻干燥步骤之后获得的制剂或药物组合物。

35 尽管本披露提供了含量范围或含量值，但本领域一般技术人员理解，所述含量范围或含量值涵盖了所测定具体值的可接受误差范围。

本披露所述的药物组合物能够达到一种稳定的效果：其中的抗体药物偶联物

在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的药物组合
物，优选地，药物组合物在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物学
活性。贮藏期一般基于药物组合物的预定保存期来选择。目前有多种测量蛋白质
稳定性的分析技术，可测量在选定温度贮藏选定时间段后的稳定性。

5 稳定的制剂是在下述情况下没有观察到显著变化的制剂：在冷藏温度(2-8°C)
保存至少 3 个月、优选 6 个月、更优选 1 年，且甚至更优选地多达 2 年。另外，
稳定的液体制剂包括这样的液体制剂：其在包括 25°C 的温度保存包括 1 个月、3
个月、6 个月在内的时段后表现出期望的特征。稳定性的典型的例子：通过
SEC-HPLC 测得，通常不超过约 10%、优选不超过约 5%的抗体单体发生聚集或降
10 解。通过视觉分析，制剂是淡黄色近无色澄明液体或者无色，或澄清至稍微乳白
色。所述制剂的浓度、pH 和重量克分子渗透压浓度具有不超过±10%变化。通常
观察到不超过约 10%、优选不超过约 5%的减少。通常形成不超过约 10%、优选不
超过约 5%的聚集。

如果在目检颜色和/或澄清度后，或者通过 UV 光散射、尺寸排阻色谱法(SEC)
15 和动态光散射 (DLS) 测得，抗体药物偶联物没有显示出显著的聚集增加、沉淀和
/或变性，那么所述抗体药物偶联物在药物制剂中“保留它的物理稳定性”。蛋白构
象的变化可以通过荧光光谱法（其确定蛋白三级结构）和通过 FTIR 光谱法（其确
定蛋白二级结构）来评价。

如果抗体药物偶联物没有显示出显著的化学改变，那么所述抗体在药物制剂
20 中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式蛋白，可以评估化
学稳定性。经常改变蛋白化学结构的降解过程包括水解或截短（通过诸如尺寸排
阻色谱法和 CE-SDS 等方法来评价）、氧化（通过诸如与质谱法或 MALDI/TOF/MS
结合的肽谱法等方法来评价）、脱酰胺作用（通过诸如离子交换色谱法、毛细管等
电聚焦、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价）和异构化（通过测量异天冬氨
25 酸含量、肽谱法等来评价）。

如果抗体药物偶联物在给定时长的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生
物活性的预定范围内，那么所述抗体药物偶联物在药物制剂中“保留它的生物活
性”。

本披露所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J. biol. chem, 243, p3558 (1968)
30 中所述。

本披露的术语“抗体”以最广义使用，其涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克
隆抗体，多克隆抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体），全长抗体或其抗原
结合片段（也称“抗原结合部分”），只要它们展现出期望的抗原结合活性。全长抗
体是包含由二硫键互相连接的至少两条重链和两条轻链的免疫球蛋白 (Ig)。免疫
35 球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可
将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和

IgE, 其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别, 又可分为不同的亚类, 如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。

5 全长抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大, 为可变区 (缩写为 Fv 区); 靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定, 为恒定区。每条重链由重链可变区 (缩写为 VH) 和重链恒定区 (缩写为 CH) 组成。重链恒定区包含 CH1、CH2 和 CH3 三个结构域。每条轻链由轻链可变区 (缩写为 VL) 和轻链恒定区 (缩写为 CL) 组成。重链可变区和轻链可变区包括高变区 (也称为互补性决定区, 缩写为 CDR 或 HVR) 和序列相对保守的骨架区 (也称框架区, 缩写为 FR)。每个 VL 和 VH 由从氨基末端排到羧基末端按以下顺序排列的 3 个 CDR 4 个 FR 组成: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3; 重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

本披露中所述人抗体重链恒定区和人抗体轻链恒定区的“常规变体”是指现有技术已公开的来源于人的不改变抗体可变区结构和功能的重链恒定区或轻链恒定区的变体, 示例性变体包括对重链恒定区进行定点改造和氨基酸替换的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区变体, 具体替换如现有技术已知的 YTE 突变, L234A 和/或 L235A 突变, S228P 突变, 265A (例如 D265A) 和/或 297A (例如 N297A), 和/或获得 knob-into-hole 结构的突变 (使得抗体重链具有 knob-Fc 和 hole-Fc 组合), 20 这些突变已被证实使得抗体具有新的性能, 但不改变抗体可变区的功能。

术语“抗原结合片段”或“功能片段”或“抗原结合部分”是指保持特异性结合抗原的能力的完整抗体的一个或更多个片段。已显示可利用全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。示例性的, 涵盖在术语“抗原结合片段”的结合片段的实例包括: (i) Fab 片段, 一种由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段; (ii) F(ab')₂ 片段, 一种包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段, (iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段; (iv) 由抗体的单臂的 VH 和 VL 结构域组成的 Fv 片段; (v) dsFv, 由 VH 和 VL 经链间二硫键形成的稳定的抗原结合片段; (vi) 包含 scFv、dsFv、Fab 等片段的双抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。此外, 虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码, 但可使用重组方法将这两个结构域通过能够使它们形成单条蛋白质链的人工肽接头来接合, 其中 VL 和 VH 配对形成单价分子, 称为单链 Fv (scFv) (参见, 例如, Bird 等人(1988) Science242 : 423-426 ; 和 Huston 等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA85: 5879-5883))。此类单链抗体也包括在术语抗体的“”抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段, 并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组 DNA 技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。

术语“氨基酸差异”或“氨基酸突变”是指相较于原蛋白质或多肽，变体蛋白质或多肽存在氨基酸的改变或突变，包括在原蛋白质或多肽的基础上发生 1 个、2 个、3 个或更多个氨基酸的插入、缺失或替换。

术语“抗体框架”或“FR 区”，是指可变结构域 VL 或 VH 的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合环（CDR）的支架。从本质上讲，其是不具有 CDR 的可变结构域。

术语“互补决定区”、“CDR”或“高变区”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的 6 个高变区之一。通常，每个重链可变区中存在三个 CDR（HCDR1、HCDR2、HCDR3），每个轻链可变区中存在三个 CDR（LCDR1、LCDR2、LCDR3）。可以使用各种公知方案中的任何一种来确定 CDR 的氨基酸序列边界，包括“Kabat”编号规则（参见 Kabat 等(1991)，“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD）、“Chothia”编号规则（参见 Al-Lazikani 等人，(1997) JMB 273：927-948）和 ImMunoGenTics(IGMT)编号规则(Lefranc M.P., Immunologist, 7, 132-136(1999); Lefranc, M.P.等, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77(2003)等。例如，对于经典格式，遵循 Kabat 规则，所述重链可变域（VH）中的 CDR 氨基酸残基编号为 31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和 95-102(HCDR3)；轻链可变域(VL)中的 CDR 氨基酸残基编号为 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)。遵循 Chothia 规则，VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和 95-102(HCDR3)；并且 VL 中的氨基酸残基编号为 26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和 91-96(LCDR3)。通过组合 Kabat 和 Chothia 两者的 CDR 定义，CDR 由人 VH 中的氨基酸残基 26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和 95-102(HCDR3)和人 VL 中的氨基酸残基 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)构成。遵循 IGMT 规则，VH 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 26-35(CDR1)、51-57(CDR2)和 93-102(CDR3)，VL 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 27-32(CDR1)、50-52(CDR2)和 89-97(CDR3)。遵循 IGMT 规则，抗体的 CDR 区可以使用程序 IGMT/DomainGap Align 确定。遵循 AbM 规则，VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-32（HCDR1）、50-58（HCDR2）和 95-102（HCDR3）；并且 VL 中的氨基酸残基编号为 24-34（LCDR1）、50-56（LCDR2）和 89-97(LCDR3)。本披露的抗体的重链可变区和轻链可变区及其 CDR 符合 Kabat 编号规则。

氨基酸序列“同一性”是指：氨基酸序列比对时（必要时允许引入间隙以达成最大的序列同一性百分比），第一序列中与第二序列中的相同氨基酸残基的百分比；其中保守性取代不视为序列同一性的一部分。为测定氨基酸序列同一性百分比，比对可以通过属于本领域技术的范围内的多种方式来实现，例如使用公开可得到的计算机软件，诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定适用于测量比对的参数，包括在所比较的序列全长

上达成最大比对所需的任何算法。

本披露工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至 GS 表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。作为一种更推荐的现有技术，哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端位点。通过表达与抗原结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如，用含调整过的缓冲液的 A 或 G Sepharose FF 柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用 pH 梯度法洗脱结合的抗体，用 SDS-PAGE 检测抗体片段，收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻，如-70°C，或者冻干。

“保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等）的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸，使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓，一般而言，多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性（参见例如 Watson 等（1987）Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页，（第 4 版））。另外，结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。示例性保守取代如下：

表 a. 氨基酸的保守取代

原始残基	保守取代
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His; Asp
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala; Val
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe

Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

术语“裸抗体”，是指未与异源模块（例如细胞毒性模块）或放射性标记物缀合的抗体。本披露中，抗体药物偶联物的含量以蛋白浓度计，即以偶联物中蛋白（抗体部分）的重量/体积计。

术语“接头单元”或“接头”是指一端与抗体或其抗原结合片段连接而另一端与药物相连的化学结构片段或键，也可以连接其他接头后再与药物相连。本披露的优选方案表示为 L 和 L¹ 至 L⁴，其中 L¹ 端与抗体相连，L⁴ 端与结构单元 Y 相连后与化合物或毒素相连。接头，包括延伸物、间隔物和氨基酸单元，可以通过本领域已知方法合成，诸如 US2005-0238649A1 中所记载的。接头可以是便于在细胞中释放药物的“可切割接头”。例如，可使用酸不稳定接头（例如脲）、蛋白酶敏感（例如肽酶敏感）接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头（Chari 等，Cancer Research 52: 127-131(1992)；美国专利 No.5,208,020）。

术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团，优选含有 1 至 12 个碳原子的烷基，更优选含有 1 至 10 个碳原子的烷基，最优选含有 1 至 6 个碳原子的烷基。非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基，及其各种支链异构体等。更优选的是含有 1 至 6 个碳原子的低级烷基，非限制性的实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基。

术语“杂烷基”指含有一个或多个选自 N、O 或 S 的杂原子的烷基，其中烷基如上所定义。

术语“亚烷基”指饱和的直链或支链脂肪族烃基，其具有两个从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。亚烷基为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团，优选含有 1 至 12 个碳原子，更优选含有 1 至 6 个碳原子的亚烷基。亚烷基的非限制性实例包括但不限于亚甲基(-CH₂-)、1,1-亚乙基(-CH(CH₃)-)、1,2-亚乙基(-CH₂CH₂-)、1,1-亚丙基(-CH(CH₂CH₃)-)、1,2-亚丙基(-CH₂CH(CH₃)-)、1,3-亚丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、1,4-亚丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)和 1,5-亚丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-)等。亚烷基可以是取代的或非取代的。当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基和氧代基中的一个或多个取代基所取代。

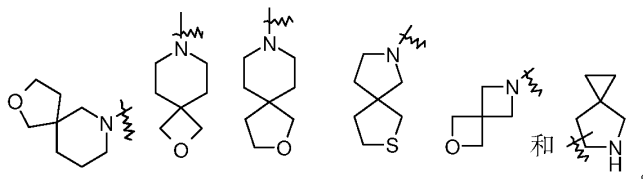
术语“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(非取代的环烷基)，其中烷基或环烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性实例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基。环烷基环包含 3 至 20 个碳原子，优选包含 3 至 12 个碳原子，更优选包含 3 至 10 个碳原子，最优选包含 3 至 7 个碳原子。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基、环辛基等；多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。

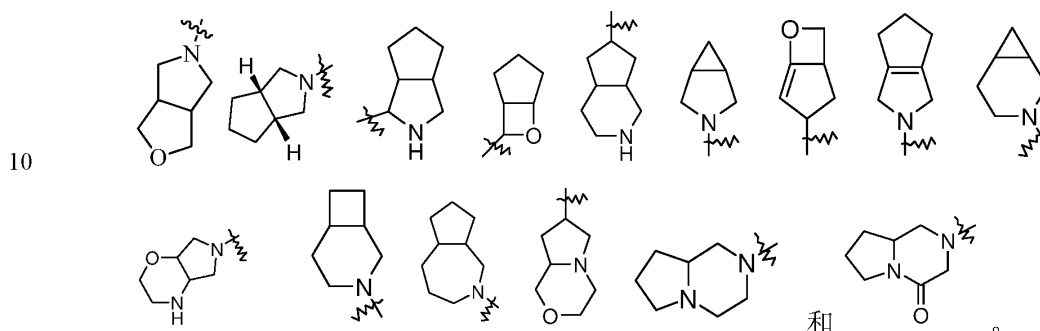
术语“杂环基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，其包含 3 至 20 个环原子，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 S(O)_m（其中 m 是整数 0 至 2）的杂原子，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分，其余环原子为碳。杂环基优选包含 3 至 12 个环原子，其中 1 至 4 个是杂原子；更优选环烷基环包含 3 至 10 个环原子。单环杂环基的非限制性实例包括吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基等。多环杂环基包括螺环、稠环和桥环的杂环基。

术语“螺杂环基”指单环之间共用一个原子(称螺原子)的 5 至 20 元多环杂环基团，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 S(O)_m(其中 m 是整数 0 至 2)的杂原子，其余环原子为碳。其可以含有一个或多个双键，但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统。优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元。根据环与环之间共用螺原子的数目将螺杂环基分为单螺杂环基、双螺杂环基或多螺杂环基，优选为单螺杂环基和双螺杂环基。更优选为 4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/5 元或 5 元/6 元

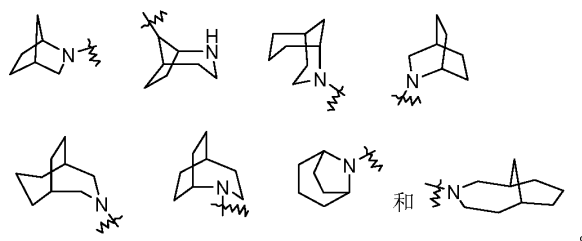
单螺杂环基。螺杂环基的非限制性实例包括：



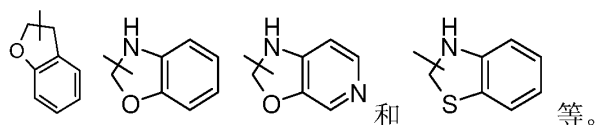
术语“稠杂环基”指 5 至 20 元多环杂环系统，其中的每个环与系统中的其他环共享一对毗邻的原子。在稠杂环基中，一个或多个环可以含有一个或多个双键，但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 S(O)_m (其中 m 是整数 0 至 2) 的杂原子，其余环原子为碳。稠杂环基优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元。根据组成环的数目，稠杂环基可以分为双环、三环、四环或多环；优选为双环或三环；更优选为 5 元/5 元、或 5 元/6 元双环稠杂环基。稠杂环基的非限制性实例包括：



术语“桥杂环基”指 5 至 14 元的多环杂环基团，其中任意两个环共用两个不直接连接的原子。桥杂环基可以含有一个或多个双键，但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整数 0 至 2) 的杂原子，其余环原子为碳。桥杂环基优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元。根据组成环的数目，桥杂环基可以分为双环、三环、四环或多环；优选为双环、三环或四环；更优选为双环或三环。桥杂环基的非限制性实例包括：

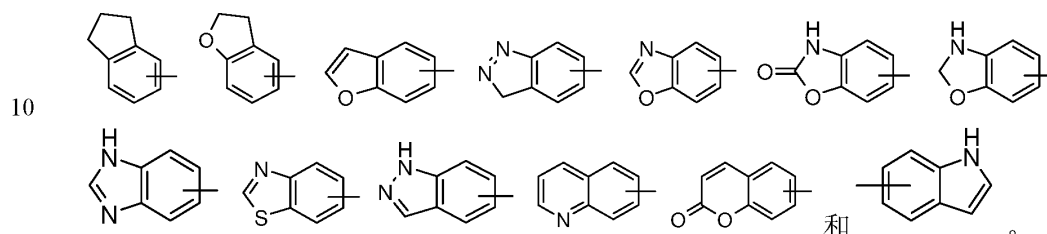


所述杂环基环可以稠合于芳基、杂芳基或环烷基环上，其中与母体结构连接
20 在一起的环为杂环基，其非限制性实例包括：



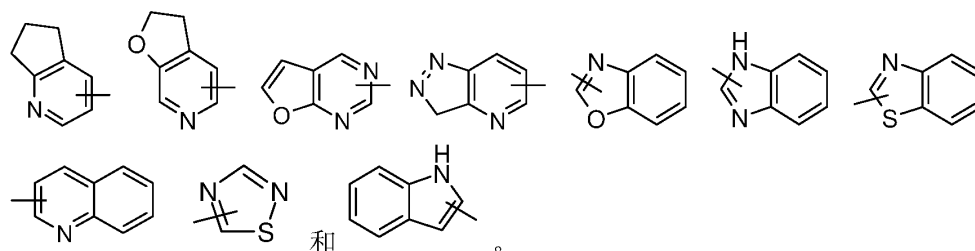
杂环基可以是任选取代的或非取代的。当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基。

术语“芳基”指具有共轭的 π 电子体系的 6 至 14 元全碳单环或稠合多环（也就是共享毗邻碳原子对的环）基团。芳基优选为 6 至 10 元，例如苯基和萘基，优选苯基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为芳基环，其非限制性实例包括：



芳基可以是取代的或非取代的。当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“杂芳基”指包含 1 至 4 个杂原子、5 至 14 个环原子的杂芳族体系，其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基优选为 5 至 10 元，更优选为 5 元或 6 元，例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、四唑基等。所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环，其非限制性实例包括：



杂芳基可以是任选取代的或非取代的。当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“氨基保护基”是这样一种基团：当分子其它部位进行反应时，为了使氨基保持不变，用易于脱去的基团对氨基进行保护。非限制性的实施例包含 9-芴甲氧羰基、叔丁氧羰基、乙酰基、苄基、烯丙基和对甲氧苄基等。这些基团可任选地被选自卤素、烷氧基或硝基中的 1-3 个取代基所取代。所述氨基保护基优选为 9-芴甲氧羰基。

术语“环烷基烷基”指烷基上的氢被一个或多个环烷基取代，优选被一个环烷基取代，其中烷基如上所定义，其中环烷基如上所定义。

术语“卤代烷基”指烷基上的氢被一个或多个卤素取代，其中烷基如上所定义。

术语“氘代烷基”指烷基上的氢被一个或多个氘原子取代，其中烷基如上所定义。

术语“羟基”指-OH 基团。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

术语“氨基”指-NH₂。

术语“硝基”指-NO₂。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如，“任选包含 1-3 个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

“取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选为最多 5 个，更优选为 1 至 3 个氢原子彼此独立地被相应数目的取代基取代。不言而喻，取代基仅处在它们的可能的化学位置，本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下确定（通过实验或理论）可能或不可能的取代。例如，具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和（如烯属）键的碳原子结合时可能是不稳定的。

术语“载药量”是指 ADC 分子中每个抗体或其抗原结合片段上加载的细胞毒性药物平均数量，也可以表示为药物量和抗体量的比值，药物载量的范围可以是每个抗体或其抗原结合片段（Pc）连接 0-12 个，优选 1-10 个，更优选 2-8 个，最优选 3.5-4.5 个细胞毒性药物（D）。在本披露的实施方式中，载药量表示为 n，示例性的 n 可以为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或 10 中的一个或多个经计算所得的均值。可用常规方法如 UV/可见光光谱法、质谱、ELISA 试验和 HPLC 特征鉴定偶联反应后每个 ADC 分子的药物平均数量。

本披露的一个实施方式中，细胞毒性药物通过接头单元偶联在抗体或其抗原结合片段的 N 端氨基、赖氨酸残基的ε-氨基和/或巯基上。一般地，偶联反应中能与抗体偶联的药物分子数将小于理论上的最大值。

可以用以下非限制性方法控制细胞毒性药物的载量，包括：

- (1) 控制连接试剂和单抗的摩尔比，
- (2) 控制反应时间和温度，
- (3) 选择不同的反应试剂。

常规的药物组合物的制备见中国药典。

术语“载体”用于本披露的药物组合物，是指能改变药物进入人体的方式和在体内的分布、控制药物的释放速度并将药物输送到靶向器官的体系。药物载体释放和靶向系统能够减少药物降解及损失，降低副作用，提高生物利用度。如可作为载体的高分子表面活性剂由于其独特的两亲性结构，可以进行自组装，形成各种形式的聚集体，优选的实例如胶束、微乳液、凝胶、液晶、囊泡等。这些聚集体具有包载药物分子的能力，同时又对膜有良好的渗透性，可以作为优良的药物载体。

“施用”、“给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“施用”、“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“施用”、“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂，例如包含本披露的任一种结合化合物的组合物，所述患者具有一种或多种疾病症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如患者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本披露的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验（H 检验）、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

“有效量”包含足以改善或预防医学疾病的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化：例如，待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

“置换”是指溶解抗体或 ADC 的溶剂体系的置换，例如，使用稳定制剂的缓冲体系经物理操作方式将含抗体或 ADC 的高盐或高渗溶剂体系置换，从而使抗体蛋白存在于稳定制剂中。所称物理操作方式包括但不限于超滤、透析或离心后复溶。

实施例

以下结合实施例进一步描述本披露，但这些实施例并非是对本披露范围的限制。本披露实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如参照冷泉港实验室出版的《抗体技术实验手册》，《分子克隆手册》；或按照原料或商品
5 制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

一、抗体药物偶联物

抗 Claudin18.2 抗体的制备

实施例 1-1：构建高表达 Claudin18.2 的细胞株

10 用 Lipofectamine 3000 转染试剂，将 pCDH-hClaudin18.2 慢病毒表达载体质粒与 pVSV-G 或 pCMV-dR8.91 慢病毒系统包装载体转染至病毒包装细胞 293T 中；收集含有病毒的培养基上清，过滤并进行超高速离心；使用浓缩后的病毒感染人胃印戒细胞癌细胞株 NUGC4，经 puromycin 筛选两至三周，再进行 FACS 单细胞分选。

15 根据肿瘤 IHC 评分来区分 Claudin18.2 表达程度。与肿瘤 IHC 评分为 3 分的肿瘤 Claudin18.2 表达水平相当的细胞为高表达细胞，与肿瘤 IHC 评分为 2 分的肿瘤 Claudin18.2 表达水平相当的细胞为中等表达细胞。

根据通过 FACS 检测慢病毒感染的 NUGC4 细胞表面的 Claudin18.2 表达，挑选出 Claudin18.2 表达量高的 NUGC4/hClaudin18.2 单克隆细胞株。同时通过 FACS
20 检测野生型 NUGC4 细胞表面的 Claudin18.2 表达，挑选出 Claudin18.2 表达量中等的 NUGC4 克隆细胞株，野生型 NUGC4 为 Claudin18.2 低表达量细胞。

将挑选出的单克隆细胞株扩大培养，冻储备库以便后续实验。

Claudin18.2 序列 Genbank: NP_001002026 (SEQ ID NO: 1) :

MAVTACQGLGFVVSLLIGIAGHIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCV
25 RESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGSME
DSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSFANMLVTNFWMSTANMYTGMGGMV
QTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASG
HSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV。

Claudin18.2 DNA 序列 (SEQ ID NO: 2) :

30 AGAATTGCGC TGTCCACTTG TCGTGTGGCT CTGTGTCGAC ACTGTGCGCC ACCATGGCCG
TGACTGCCTG TCAGGGCTTG GGGTTCGTGG TTCTACTGAT TGGGATTGCG GGCATCATTG
CTGCCACCTG CATGGACCAG TGGAGCACCC AAGACTTGTA CAACAACCCC GTAACAGCTG
TTTTCAACTA CCAGGGGCTG TGGCGCTCCT GTGTCCGAGA GAGCTCTGGC TTCACCGAGT
GCCGGGGCTA CTTACCCCTG CTGGGGCTGC CAGCCATGCT GCAGGCAGTG CGAGCCCTGA
35 TGATCGTAGG CATCGTCTTG GGTGCCATTG GCCTCCTGGT ATCCATCTTT GCCCTGAAAT
GCATCCGCATTGGCAGCATG GAGGACTCTG CCAAAGCCAA CATGACACTG ACCTCCGGGA
TCATGTTTAT TGTCTCAGGT CTTTGTGCAA TTGCTGGAGT GTCTGTGTTT GCCAACATGC
TGGTGACTAA CTTCTGGATG TCCACAGCTA ACATGTACAC CGGCATGGGT GGGATGGTGC

AGACTGTTCA GACCAGGTAC ACATTTGGTG CGGCTCTGTT CGTGGGCTGG GTCGCTGGAG
GCCTCACACT AATTGGGGGT GTGATGATGT GCATCGCCTG CCGGGGCCTG GCACCAGAAG
AAACCAACTA CAAAGCCGTT TCTTATCATG CCTCAGGCCA CAGTGTTGCC TACAAGCCTG
GAGGCTTCAAGGCCAGCACT GGCTTTGGGT CCAACACCAA AAACAAGAAG ATATACGATG
5 GAGGTGCCCC CACAGAGGAC GAGGTACAAT CTTATCCTTC CAAGCACGAC TATGTGTAAT
GCTCTAAGACCTCTCAGCACGGGCGGAAGA AACTCCCGGA GAGCTCACCC AAAAAACAAG
GAGATCCCAT CTAGATTTCT TCTTGCTTTT GACTCACAGC TGAAGTTAG AAAAGCCTCG
ATTTCATCTT TGGAGAGGCC AAATGGTCTT AGCCTCAGTC TCTGTCTCTA AATATTCCAC
CATAAAACAG CTGAGTTATT TATGAATTAG AGGCTATAGC TCACATTTTC AATCCTCTAT
10 TTCTTTTTTT AAATATAACT TTCTACTCTG ATGAGAGAAT GTGGTTTTAA TCTCTCTCTC
ACATTTTGAT GATTTAGACA GACTCCCCCT CTTCTCCTA GTCAATAAAC CCATTGATGA
TCTATTTCCC AGCTTATCCC CAAGAAAAC TTTGAAAGGA AAGAGTAGAC CCAAAGATGT
TATTTTCTGC TGTTTGAATT TTGTCTCCCC ACCCCCAACT TGGCTAGTAA TAAACACTTA
CTGAAGAAGA AGCAATAAGA GAAAGATATT TGTAATCTCT CCAGCCCATG ATCTCGGTTT
15 TCTTACACTG TGATCTTAAA AGTTACCAA CCAAAGTCAT TTTCAGTTTG AGGCAACCAA
ACCTTTCTAC TGCTGTTGAC ATCTTCTTAT TACAGCAACA CCATTCTAGG AGTTTCCTGA
GCTCTCCACT GGAGTCCTCT TTCTGTCGCG GGTCAGAAAT TGTCCTAGA TGAATGAGAA
AATTATTTTT TTTAATTTAA GTCCTAAATA TAGTTAAAAT AAATAATGTT TTAGTAAAAT
GATACACTAT CTCTGTGAAA TAGCCTCACC CCTACATGTG GATAGAAGGA AATGAAAAAA
20 TAATTGCTTT GACATTGTCT ATATGGTACT TTGTAAAGTC ATGCTTAAGT ACAAATTCCA
TGAAAAGCTC ACTGATCCTA ATTCTTTCCC TTTGAGGTCT CTATGGCTCT GATTGTACAT
GATAGTAAGT GTAAGCCATG TAAAAAGTAA ATAATGTCTG GGCACAGTGG CTCACGCTG
TAATCCTAGCACTTTGGGAG GCTGAGGAGG AAGGATCACT TGAGCCCAGA AGTTCGAGAC
TAGCCTGGGCAACATGGAGAAGCCCTGTCT CTACAAAATA CAGAGAGAAA AAATCAGCCA
25 GTCATGGTGG CCTACACCTG TAGTCCCAGC ATTCCGGGAG GCTGAGGTGG GAGGATCACT
TGAGCCCAGGAGGTTGGGG CTGCAGTGAG CCATGATCAC ACCACTGCAC TCCAGCCAGG
TGACATAGCGAGATCCTGTC TAAAAAATA AAAAATAAAT AATGGAACAC AGCAAGTCCT
AGGAAGTAGGTTAAACTAA TTCTTTAAAA AAAAAAAAAA GTTGAGCCTG AATTAAATGT
AATGTTTCCA AGTGACAGGT ATCCACATTT GCATGGTTAC AAGCCACTGC CAGTTAGCAG
30 TAGCACTTTC CTGGCACTGT GGTGCGTTTT GTTTTGTGTT GCTTTGTTA GAGACGGGGT
CTCACTTTCC AGGCTGGCCT CAACTCCTG CACTCAAGCA ATTCTTCTAC CCTGGCCTCC
CAAGTAGCTG GAATTACAGG TGTGCGCCAT CACAACAGC TGGTGGTCAG TTTTGTACT
CTGAGAGCTG TTCACTTCTC TGAATTCACC TAGAGTGGTT GGACCATCAG ATGTTTGGGC
AAAACAGAAA GCTCTTTGCA ACCACACACC TTCCCTGAGC TTACATCACT GCCCTTTGA
35 GCAGAAAGTC TAAATTCCTT CCAAGACAGT AGAATTCCAT CCCAGTACCA AAGCCAGATA
GGCCCCCTAGGAACTGAGG TAAGAGCAGT CTCTAAAAAC TACCCACAGC AGCATTGGTG
CAGGGGAACT TGGCCATTAG GTTATTATTT GAGAGGAAAG TCCTCACATC AATAGTACAT
ATGAAAGTGACCTCCAAGGG GATTGGTGAA TACTCATAAG GATCTTCAGG CTGAACAGAC
TATGTCTGGG GAAAGAACGG ATTAGCCCC ATTAATAAAC AAGTTGTGTT CAAGAGTCAG
40 AGCAGTGAGCTCAGAGGCC TTCTCACTGA GACAGCAACA TTAAACCAA ACCAGAGGAA
GTATTTGTGG AACTCACTGC CTCAGTTTGG GTAAAGGATG AGCAGACAAG TCAACTAAAG
AAAAAAGAAAAGCAAGGAGGAGGTTGAGC AATCTAGAGC ATGGAGTTTG TTAAGTGCTC
TCTGGATTTG AGTTGAAGAG CATCCATTTG AGTTGAAGGC CACAGGGCAC AATGAGCTCT
CCCTTCTACC ACCAGAAAGT CCCTGGTCAG GTCTCAGGTA GTGCGGTGTG GCTCAGCTGG
45 GTTTTTAATT AGCGCATTCT CTATCCAACA TTTAATTGTT TGAAAGCCTC CATATAGTTA

GATTGTGCTT TGTAATTTTG TTGTTGTTGC TCTATCTTAT TGTATATGCA TTGAGTATTA
ACCTGAATGT TTTGTTACTT AAATATTAAA AACACTGTTA TCCTACAGTT.

实施例 1-2: 抗人 claudin18.2 单克隆抗体产生

5 1 免疫

通过免疫小鼠产生抗人 Claudin18.2 单克隆抗体。

实验用 SJL 白小鼠, 雌性, 6-8 周龄 (北京维通利华实验动物技术有限公司 Charles River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., Beijing; 动物生产许可证号: SCXK (京) 2012-0001)。饲养环境: SPF 级。小鼠购进后, 实验室环境饲养 1 周,
10 12/12 小时光/暗周期调节, 温度 20-25 °C; 湿度 40-60%。将已适应环境的小鼠按以下方案免疫。免疫抗原为 huClaudin18.2-HEK293 细胞 (转染人 Claudin18.2 质粒的 HEK-293 稳转细胞株)。

免疫方案: 首次免疫细胞前, 用 TiterMax® Gold Adjuvant (Sigma Cat No. T2684) 0.1ml/只注射小鼠腹膜内 (IP); 半小时后每只小鼠腹膜内 (IP) 注射 0.1ml
15 生理盐水稀释至 1×10^8 /ml 浓度的细胞液。细胞吹散均匀后进行接种, 时间为第 0、14、28、42、56 天。于第 21, 35, 49, 63 天取血, 用 ELISA 方法确定小鼠血清中的抗体滴度。在第 4-5 次免疫以后, 选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前 3 天加强免疫, 腹膜内 (IP) 注射 1×10^7 细胞。

20 2 脾细胞融合

采用 PEG 介导的融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0 细胞 (ATCC® CRL-8287™) 进行融合得到杂交瘤细胞。杂交瘤细胞以 $0.5-1 \times 10^6$ /ml 的密度用完全培养基 (含 20% FBS、1×HAT、1×OPI 的 IMDM 培养基) 重悬, 100μl/孔种于 96 孔板中, 37°C, 5%CO₂ 孵育 3-4 天后, 补充 HAT 完全培养基 100μl/孔, 继续培养 3-4 天至形成克隆。去除上清, 加入 200μl/孔的 HT 完全培养基 (含 20%FBS、1×HT
25 和 1×OPI 的 IMDM 培养基), 37°C, 5%CO₂ 培养 3 天后进行 ELISA 检测。

3 杂交瘤细胞筛选

根据杂交瘤细胞生长密度, 用结合 ELISA 方法检测培养上清。选择与 huClaudin18.2-HEK293 细胞结合能力强, 同时与 HEK293 细胞没有结合的细胞,
30 及时进行扩增冻存; 经过二到三次亚克隆直至获得单细胞克隆。

每次亚克隆细胞均需进行细胞结合实验。通过以上实验筛选得到杂交瘤克隆, 用无血清细胞培养法进一步制备抗体, 按纯化实例纯化抗体, 供在检测例中使用。

实施例 1-3: 鼠源抗体的人源化

35 挑选出体外活性高的单克隆杂交瘤细胞株 mAb1901, mAb1902; 克隆其中的单克隆抗体序列, 再进行人源化、重组表达和活性评价。

从杂交瘤中克隆序列的过程如下。收集对数生长期杂交瘤细胞，用 Trizol (Invitrogen, 15596-018) 提取 RNA (按照试剂盒说明书步骤) 并进行反转录 (PrimeScript™ Reverse Transcriptase, Takara, cat # 2680A)。将反转录得到的 cDNA 采用 mouse Ig-Primer Set (Novagen, TB326 Rev.B 0503) 进行 PCR 扩增，送测序公司测序。得到的 DNA 序列对应的氨基酸序列 SEQ ID NO: 3-6 所示：

mAb1901 鼠源重链可变区 (SEQ ID NO: 3)

EVQLMESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYGIHWVRQAPEMGLEWIAYISR
GSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARGGYDTRN
AMDYWGQGTSTVTVSS;

10 mAb1901 鼠源轻链可变区 (SEQ ID NO: 4)

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLI
YGASTRASGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYHCQNDLYYPLTFGAGTK
LELK;

mAb1902 鼠源重链可变区 (SEQ ID NO: 5)

15 EVQLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIHP
NSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSSSTAYMQLSSLPSEDSAVYYCARLKTGNSFDY
WGQGTTLTVSS;

mAb1902 鼠源轻链可变区 (SEQ ID NO: 6)

20 DIVLTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLI
YWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYYCQNAYTYPFTFGSGTK
LEIK;

上述鼠源重链可变区和轻链可变区分别与下述人 IgG1 抗体的重链恒定区和人源 κ 轻链恒定区连接形成嵌合抗体 ch1901 和 ch1902。

各抗体的恒定区选自以下序列：

25 人 IgG1 抗体的重链恒定区：(SEQ ID NO: 7)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVQLHQLDNLGKEYKCKVSNKALPAPIE
30 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK;

人源 κ 轻链恒定区：(SEQ ID NO: 8)

35 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

如本领域许多文献公示的方法，对鼠源单克隆抗体进行人源化。简言之，使用人恒定结构域替代亲本（鼠源抗体）恒定结构域，根据鼠源抗体和人抗体的同源性选择人种系抗体序列，进行 CDR 移植。本发明选择活性好的候选分子进行人源化，结果如下。

5 1、鼠源抗体的 CDR 区

表 1 中 VH/VL CDR 的氨基酸残基由 Kabat 编号系统确定并注释。

鼠源抗体的 CDR 序列如表 1 所述：

表 1. 鼠源抗体的 CDR 序列

抗体	mAb1901
HCDR1	DYGIH (SEQ ID NO: 9)
HCDR2	YISRGSTIYYADTVKG (SEQ ID NO: 10)
HCDR3	GGYDTRNAMDY (SEQ ID NO: 11)
LCDR1	KSSQSLLNSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 12)
LCDR2	GASTRAS (SEQ ID NO: 13)
LCDR3	QNDLYYPLT (SEQ ID NO: 14)
抗体	mAb1902
HCDR1	SYWMH (SEQ ID NO: 15)
HCDR2	MIHPNSGSTNYNEKFKGR (SEQ ID NO: 16)
HCDR3	LKTGNSFDY (SEQ ID NO: 17)
LCDR1	KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 18)
LCDR2	WASTRES (SEQ ID NO: 19)
LCDR3	QNAYTYPFT (SEQ ID NO: 20)

10 2、选择人种系 FR 区序列

在所获得的鼠源抗体 VH/VL CDR 典型结构的基础上，将重、轻链可变区序列与抗体 Germline 数据库比较，获得同源性高的人种系模板。其中人类种系轻链框架区来自人 κ 轻链基因。

2.1 mAb1901 的人源化改造和回复突变设计

15 选择适当的人抗体种系，对 mAb1901 鼠源抗体进行人源化改造，将鼠源抗体 mAb1901 的 CDR 区移植到选择的人源化模板上，替换人源化可变区，再与 IgG 恒定区重组，形成完整抗体。同时，对人源化抗体的 V 区中 FR 区进行回复突变，示例性回复突变方式及组合如下：

表 2. mAb1901 人源化抗体及回复突变*

mAb1901 人源化抗体轻链可变区		mAb1901 人源化抗体重链可变区	
VL1	无	VH1	无
VL2	N22S	VH2	N82T
VL3	N22S、V85I、Y87H	VH3	V48I、N82T
		VH4	I69M、N82T

20 *表格中所有氨基酸位置编号为 Kabat 编号规则的编号，重链可变区的 N82T 中，82 为 Kabat 规则的第 82A 位。

表 3. mAb1901 人源化抗体轻链可变区和重链可变区序列

可变区名称 (SEQ ID NO:)	序列
VL1 (SEQ ID NO: 21)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKP GPPKLLIYGASTRASGVPDFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QNDLYYPLTFGQGTKLEIK
VL2 (SEQ ID NO: 22)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYGASTRASGVPDFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ NDLYYPLTFGQGTKLEIK
VL3 (SEQ ID NO: 23)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYGASTRASGVPDFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAIYHCQ NDLYYPLTFGQGTKLEIK
VH1 (SEQ ID NO: 24)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGKGLE WVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMTSLRAEDTAV YYCARGGYDTRNAMDYWGQGTITVTVSS
VH2 (SEQ ID NO: 25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGKGLE WVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMTSLRAEDTAV YYCARGGYDTRNAMDYWGQGTITVTVSS
VH3 (SEQ ID NO: 26)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGKGLE WIAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMTSLRAEDTAV YYCARGGYDTRNAMDYWGQGTITVTVSS
VH4 (SEQ ID NO: 27)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGKGLE WVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNSLYLQMTSLRAEDTA VYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTITVTVSS

5 上表中对应重链可变区与 SEQ ID NO: 7 所示的人 IgG1 重链恒定区连接形成全长抗体的重链，轻链可变区与 SEQ ID NO: 8 所示的人 κ 轻链恒定区连接形成全长抗体的轻链。在其他实施方案中，重链可变区和轻链可变区也可与其他重链恒定区和轻链恒定区分别连接形成全长抗体。

2.2 mAb1902 的人源化改造和回复突变设计

10 选择适当的人抗体种系，对 mAb1902 鼠源抗体进行人源化改造，将鼠源抗体 mAb1902 的 CDR 区移植到选择的人源化模板上，替换人源化可变区，再与 IgG 恒定区重组，形成完整抗体。同时，对人源化抗体的 V 区中 FR 区进行回复突变，示例性回复突变方式及组合如下：

表 4. mAb1902 人源化抗体及其回复突变设计*

mAb1902 人源化抗体轻链可变区		mAb1902 人源化抗体重链可变区	
VL11	无	VH11	无
VL12	M4L	VH12	I69L、R71L、T73K
VL13	M4L、N22S	VH13	M48I、R66K、V67A、I69L、R71L、T73K
		VH14	R38K、A40R、M48I、R66K、V67A、I69L、R71L、T73K

15 *表格中所有氨基酸位置编号为 Kabat 编号规则的编号。

表 5. mAb1902 人源化抗体轻链可变区和重链可变区序列

可变区名称 (SEQ ID NO:)	序列
VL11 (SEQ ID NO: 28)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIK
VL12 (SEQ ID NO: 29)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIK
VL13 (SEQ ID NO: 30)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIK
VH11 (SEQ ID NO: 31)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQRLEWMGMIHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDTASTAYMELS LRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTITVTVSS
VH12 (SEQ ID NO: 32)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQRLEWMGMIHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDLTKASTAYMELS LRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTITVTVSS
VH13 (SEQ ID NO: 33)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAP GQRLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKASTAYMELSS LRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTITVTVSS
VH14 (SEQ ID NO: 34)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVKQRP GQRLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKASTAYMELSS LRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTITVTVSS

5 上表中对应重链可变区与 SEQ ID NO: 7 所示的人 IgG1 重链恒定区连接形成全长抗体的重链，轻链可变区与 SEQ ID NO: 8 所示的人 κ 轻链恒定区连接形成全长抗体的轻链。

嵌合抗体 ch1901

ch1901 重链: (SEQ ID NO: 35)

EVQLMESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYGIHWVRQAPEMGLEWIAYISR
10 GSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARGGYDTRN
AMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
15 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK;

ch1901 轻链: (SEQ ID NO: 36)

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLI
20 YGASTRASGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYHCQNDLYYPLTFGAGTK
LELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG

NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC;

嵌合抗体 ch1902

ch1902 重链: (SEQ ID NO: 37)

5 EVQLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPQGQLEWIGMIHP
NSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSSSTAYMQLSSLPSEDSAVYYCARLKTGNSFDY
WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
10 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK;

ch1902 轻链: (SEQ ID NO: 38)

15 DIVLTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQP
YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTITSSVQAEDLAIIYCCQNAVYTPFTFGSGTK
LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC。

20

表 6. mAb1901 人源化抗体

轻重链	H1	H2	H3	H4
L1	h1901-1	h1901-2	h1901-3	h1901-4
L2	h1901-5	h1901-6	h1901-7	h1901-8
L3	h1901-9	h1901-10	h1901-11	h1901-12

全长抗体轻重链序列如下所示:

表 7. mAb1901 人源化抗体轻链和重链序列

可变区名 称 (SEQ ID NO:)	序列
L1 (SEQ ID NO: 39)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKPGQP PKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGTDFTLTITSSVQAEDVAVYYCQNDLYY PLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

L2 (SEQ ID NO: 40)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDLYYP LTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L3 (SEQ ID NO: 41)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAIYHCQNDLYYP LTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
H1 (SEQ ID NO: 42)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGIHWVRQAPGKGLEWVA YISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARG GYDTRNAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
H2 (SEQ ID NO: 43)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGIHWVRQAPGKGLEWVA YISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARG GYDTRNAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
H3 (SEQ ID NO: 44)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGIHWVRQAPGKGLEWIA YISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARG GYDTRNAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

H4 (SEQ ID NO: 45)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGIHWVRQAPGKGLEWVA YISRGSSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCAR GGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
------------------------	--

表 8. mAb1902 人源化抗体

轻重链	H11	H12	H13	H14
L11	h1902-1	h1902-2	h1902-3	h1902-4
L12	h1902-5	h1902-6	h1902-7	h1902-8
L13	h1902-9	h1902-10	h1902-11	h1902-12

全长抗体轻重链序列如下所示：

5

表 9. mAb1901 人源化抗体轻链和重链序列

可 变 区 名 称 (SEQ ID NO:)	序 列
L11 (SEQ ID NO: 46)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQ PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNAV YPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L12 (SEQ ID NO: 47)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQP PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNAV YPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
L13 (SEQ ID NO: 48)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQP PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNAV YPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
H11 (SEQ ID NO: 49)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLE WMGMHPNSGSTNYNEFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVY YCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

H12 (SEQ ID NO: 50)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLE WMGMHPNSGSTNYNEKFKGRVTLTLDKSASTAYMELSSLRSED TAVY YCARLKTGNSFDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
H13 (SEQ ID NO: 51)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLE WIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAYMELSSLRSED TAVY CARLKTGNSFDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA GCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
H14 (SEQ ID NO: 52)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLE WIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAYMELSSLRSED TAVY CARLKTGNSFDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA GCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

本披露阳性对照抗体为 IMAB-362 (来自 WO2016166122)。

重链 (SEQ ID NO: 53)

5	QVQLQQPGAE	LVRPGASVKL	SCKASGYTFT	SYWINWVKQR	PGQGLEWIGN
	IYPSDSYTN	NQKFKDKATL	TVDKSSSTAY	MLSSPTSED	SAVYYCTRSW
	RGNSFDYWGQ	GTTLTVSSAS	TKGPSVFPLA	PSSKSTSGGT	AALGCLVKDY
	FPEPVT VSWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGL	YSLSSVTVTP	SSSLGTQTYI
	CNVNHKPSNT	KVDKRVEPKS	CDKTHTCPPC	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD
	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQYNST
10	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY
	TLPPSREEMT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTTPVLD
	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPGK;

轻链 (SEQ ID NO: 54)

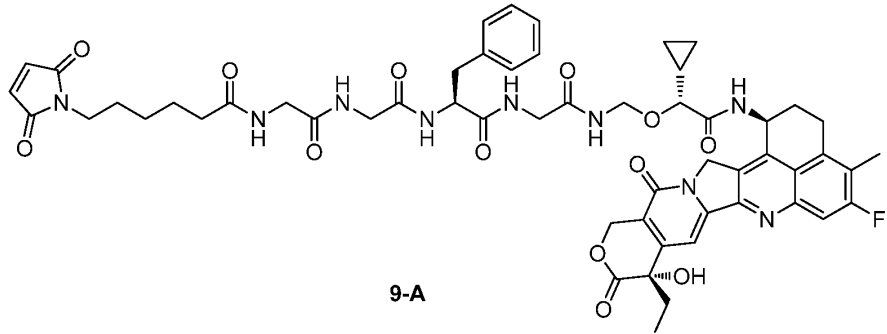
15	DIVMTQSPSS	LTVTAGEKVT	MSCKSSQSLL	NSGNQKNYLT	WYQQKPGQPP
	KLLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEDLA	VYYCQNDYSY
	PFTFGSGTKL	EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ	LKSGTASVVC	LLNNFYPREA	
	KVQWKVDNAL	QSGNSQESVT	EQDSKDSTYS	LSSTLTLSKA	DYKHKVYAC
	EVTHQGLSSP	VTKSFNREGC			

用常规基因克隆、重组表达的方法分别克隆、表达、纯化上述抗体。

抗 Claudin18.2 ADC 偶联物的制备

药物

本披露中抗 Claudin18.2 ADC 偶联物的药物部分可以是任意适宜的药物。特别
5 适宜的药物描述于例如 PCT 公开号 WO2020063676A1（通过援引完整收入本文）。
本披露的化合物 9-A 是 N-((2R,10S)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟
基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]咪唑
嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-
基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺，其具有如下的结构：



ADC 原液药物载量分析

1. UV-HPLC 方法

将装有琥珀酸钠缓冲液的比色皿分别置于参比吸收池和样品测定吸收池中
15 后，扣除溶剂空白后，再将装有待测样品溶液的比色皿置于样品测定吸收池中，
测定 280nm 和 370nm 处吸光度。

结果计算：采用紫外分光光度法（使用仪器： Thermo nanodrop2000 紫外分
光光度计）测定 ADC 原液载量，其原理是在某波长下 ADC 原液的总吸光值等于
药物与单克隆抗体在该波长下吸光值的相加，即：

- 20 (1) $A_{280nm} = \epsilon_{mab-280}bC_{mab} + \epsilon_{Drug-280}bC_{Drug}$
 $\epsilon_{Drug-280}$: 药物在 280nm 平均摩尔消光系数 5100;
 C_{Drug} : 药物的浓度;
 $\epsilon_{mab-280}$: 单抗原液在 280nm 平均摩尔消光系数 214600;
 C_{mab} : 单抗原液的浓度;
25 b : 光程长度为 1cm。

同理可以得到样品在 370nm 下的总吸光值方程：

- (2) $A_{370nm} = \epsilon_{mab-370}bC_{mab} + \epsilon_{Drug-370}bC_{Drug}$
 $\epsilon_{Drug-370}$: 药物在 370nm 平均摩尔消光系数 19000;
 C_{Drug} : 药物的浓度;
30 $\epsilon_{mab-370}$: 单抗原液在 370nm 消光系数为 0;

C_{mab} : 单抗原液的浓度;
 b : 光程长度为 1cm。

由(1)和(2)两种方程结合单克隆抗体和药物在两个检测波长下的消光系数和浓度数据可以计算出药物的载量。

5 药物载量= $C_{\text{Drug}}/C_{\text{mab}}$ 。

2. RP-HPLC 方法

裸抗体和待测 ADC 样品 (浓度为 1 mg/ml), 加入 4 μ l DDT (sigma) 还原, 37°C 水浴 1 小时, 结束后取出到内插管中。使用高效液相色谱仪 Agilent 1200 进行检测, 色谱柱选用 Agilent PLRP-S 1000A 8 μ m 4.6*250 mm, 柱温: 80°C; DAD 检测器波长 280 nm; 流速: 1 mL/min; 进样量为: 40 μ L; 之后通过样品与裸抗体的谱图比对, 区分出轻重链的位置, 然后对检测样品的谱图进行积分, 计算出 DAR 值。

溶液配制:

15 1) 0.25M DTT 溶液:

配制示例: 取 DTT 5.78 mg, 加入 150 μ l 纯化水充分溶解后, 配得 0.25M DTT 溶液, -20°C 保存。

2) 流动相 A (0.1% TFA 水溶液):

20 配制示例: 量筒量取 1000 ml 纯化水, 加入 1 mL TFA (sigma), 充分混匀后使用, 2-8°C 保存 14 天。

3) 流动相 B (0.1% TFA 乙腈溶液):

配制示例: 量筒量取 1000 ml 乙腈, 加入 1 mL TFA, 充分混匀后使用, 2-8°C 保存 14 天。

数据分析:

25 通过样品与裸抗体的谱图比对, 区分出轻链与重链的位置, 然后对检测样品的谱图进行积分, 计算出 DAR 值。

计算公式如下:

表 10. ADC 轻链与重链载药标记表

名称	连接药物数
LC	0
LC+1	2
HC	0
HC+1	2
HC+2	4
HC+3	6

30 LC 峰面积总和=LC 峰面积+LC+1 峰面积;

HC 峰面积总和=HC 峰面积+HC+1 峰面积+ HC+2 峰面积+ HC+3 峰面积;

LC DAR= Σ (连接药物数*峰面积百分比)/LC 峰面积总和;

HC DAR= Σ (连接药物数*峰面积百分比)/HC 峰面积总和;

DAR=LC DAR+ HC DAR。

5 实施例 1-4: ADC-1/ADC-2

在 37°C 条件下, 向含抗体 h1902-5 的 PBS 缓冲液 (pH=6.5、0.05M 的 PBS 缓冲液; 10.0 mg/mL, 320.0 mL, 21.62 μ mol) 加入三(2-羧乙基)膦 (TCEP) 的水溶液 (10 mM, 11.03 mL, 110.3 μ mol), 置于水浴振荡器, 于 37°C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。

10 将反应液用水浴降温至 25°C, 再将化合物 9-A (350mg, 303 μ mol) 溶解于 13.2ml 乙腈和 6.6ml DMSO 中后加入到反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25°C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。

反应液通过超滤膜纯化, 除去小分子。纯化先后采用 5L 的 50mM pH=6.5 PBS 缓冲液 (4% 乙腈 2% DMSO) 和 5L 的 10mM pH=5.3 琥珀酸缓冲液。随后在经纯化的溶液中加入蔗糖至 60mg/mL、吐温-20 至 0.2mg/mL, 制备得到 ADC-1 (10mM、pH=5.3 的琥珀酸缓冲液; 10mg/mL, 2.626g), 收率: 81.81%。后制成 20mg/瓶的冻干粉。

UV-HPLC 计算平均值: n=6.8。

使用上述方法, 可以用抗体 h1901-11 代替 h1902-5, 和化合物 9-A 制备得到
20 ADC-2, n=7.1。

实施例 1-5: ADC-3

在 37°C 条件下, 向含抗体 h1901-11 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 1 mL, 67.5 nmol) 加入配置好的 TCEP 水溶液 (10 mM, 10.1 μ L, 101nmol), 置于水浴振荡器, 于 37 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 9-A (0.58mg, 540nmol) 溶解于 34 μ L DMSO 中, 加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化 (洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到 ADC-3 的 PBS 缓冲液 (0.72 mg/mL, 11.2 mL), 于 4°C 储存。
30 RP-HPLC 计算平均值: n=2.51。

实施例 1-6: ADC-4

在 37°C 条件下, 向含抗体 h1901-11 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 1 mL, 67.5 nmol) 加入配置好的 TCEP 水溶液 (10 mM, 16.9 μ L, 169nmol), 置于水浴振荡器, 于 37 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反
35

应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 9-A (0.73mg, 680nmol) 溶解于 43 μ l DMSO 中, 加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化 (洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到 ADC-4 的 PBS 缓冲液 (0.62 mg/mL, 12.5 mL), 于 4 °C 储存。RP-HPLC 计算平均值: n=4.06。

实施例 1-7: ADC-5

在 37 °C 条件下, 向抗体 h1901-11 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 1 mL, 67.5 nmol) 加入配置好的 TCEP 水溶液 (10 mM, 35.8 μ L, 358nmol), 置于水浴振荡器, 于 37 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 9-A (1.09mg, 1015nmol) 溶解于 64 μ l DMSO 中, 加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化 (洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到 ADC-5 的 PBS 缓冲液 (0.54 mg/mL, 12.5 mL), 于 4 °C 储存。RP-HPLC 计算平均值: n=6.8。

实施例 1-8: ADC-6

在 37 °C 条件下, 向抗体 h1902-5 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 1.08 mL, 72.9 nmol) 加入配置好的 TCEP 水溶液 (10 mM, 10.9 μ L, 109nmol), 置于水浴振荡器, 于 37 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 9-A (0.63mg, 587nmol) 溶解于 40 μ l DMSO 中, 加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化 (洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到 ADC-6 的 PBS 缓冲液 (0.7 mg/mL, 13.0 mL), 于 4 °C 储存。RP-HPLC 计算平均值: n=2.69。

实施例 1-9: ADC-7

在 37 °C 条件下, 向抗体 h1902-5 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 1.08 mL, 72.9 nmol) 加入配置好的 TCEP 水溶液 (10 mM, 18.3 μ L, 183nmol), 置于水浴振荡器, 于 37 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 9-A (0.79mg, 736nmol) 溶解于 50 μ l DMSO 中, 加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用 Sephadex

G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到 ADC-7 的 PBS 缓冲液 (0.6 mg/mL, 14.0 mL), 于 4 °C 储存。
RP-HPLC 计算平均值: n=4.25。

5 **实施例 1-10: ADC-8**

在 37 °C 条件下, 向抗体 h1902-5 的 PBS 缓冲水溶液(pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 1.08 mL, 72.9 nmol)加入配置好的 TCEP 水溶液(10 mM, 38.7 μL, 387nmol), 置于水浴振荡器, 于 37 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

10 将化合物 9-A (1.18mg, 1099nmol) 溶解于 70 μl DMSO 中, 加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到 ADC-8 的 PBS 缓冲液 (0.56 mg/mL, 14.2 mL), 于 4 °C 储存。
RP-HPLC 计算平均值: n=7.01。

15

实施例 1-11: ADC-9

在 12 °C 条件下, 向含抗体 h1902-5 的组氨酸-醋酸-Tris/EDTA 缓冲液(pH 7.2 的 10mM 组氨酸-醋酸-Tris 和 2.5 mM EDTA 的缓冲液; 20.6g/L, 6.49L, 0.91mmol) 中加入配制好的 TCEP 组氨酸缓冲液 (10mM 组氨酸缓冲液; 1.717mM, 1.16L 20 1.99mmol), 置于恒温水浴锅中, 于 12°C 下搅拌反应 2 小时, 停止反应, 得到中间体 I 溶液。

将化合物 9-A (4.72g, 4.39mmol) 溶解于 0.38 L DMSO 中, 生成化合物 9-A 的 DMSO 溶液。向上述中间体 I 溶液中预加 0.38 L DMSO, 再加入上述化合物 9-A 的 DMSO 溶液, 置于恒温水浴锅中, 于 12°C 下搅拌反应 1 小时, 停止反应。

25 将上述反应液经 Capto S Impact 阳离子层析柱纯化, 分别用 9 个柱体积的含有 10% (v/v) DMSO 的 0.05M 醋酸缓冲液 (pH=5.0) 和 6 个柱体积 0.05M 醋酸缓冲液 (pH=5.0) 洗涤, 再用 0.05M 醋酸、0.30M 氯化钠缓冲液 (pH=5.5) 进行洗脱, 去除反应液中游离毒素和残留溶剂。在 22°C 下, 将阳离子洗脱液进行 7 倍体积等体积超滤(超滤膜包采用 30KD 的聚纤维素膜包)得到产物 ADC-9。RP-HPLC 计
30 算平均值: n=4.1。

生物学评价

测试例 1: 细胞 Cell 水平 ELISA 结合实验

基于细胞的 ELISA 实验被用来检测 Claudin18.2 抗体的结合特性。将稳转表达
35 Claudin18.2 的 NUGC4 细胞培养于 96 孔细胞板 (Corning, 3599) 中, 待生长至 90%密度时加入 4%多聚甲醛固定细胞 1 小时, 用 PBST 缓冲液(pH 7.4 PBS 含 0.05%

Tween-20) 洗板 3 次后, 加入用 PBS 稀释的 5%脱脂牛奶(光明脱脂奶粉) 封闭液 200μl/孔, 37°C 孵育箱孵育 2.5 小时或 4°C 放置过夜(16-18 小时) 进行封闭。封闭结束后, 弃去封闭液, 并用 PBST 缓冲液洗板 3 次后, 加入 50μl/孔用样品稀释液 (pH7.4 PBS 含 1% 脱脂乳) 稀释的不同浓度待测抗体, 放于 37°C 孵育箱孵育 2 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 5 次, 加入 100μl/孔用样品稀释液稀释的 HRP 标记的羊抗人二抗 (Jackson Immuno Research, 109-035-003), 37°C 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 6 次后, 加入 50μl/孔 TMB 显色底物 (KPL, 52-00-03), 于室温孵育 10-15min, 加入 50μl/孔 1M H₂SO₄ 终止反应, 用 MD Versa Max TM 酶标仪在 450nm 处读取吸收值, 计算 Claudin18.2 抗体对 Claudin18.2 的结合 EC₅₀ 值。

10 表 11. 抗体的结合活性

抗体	IMAB362	ch1901	ch1902
Emax	1.175	1.399	1.272
EC50 (nM)	0.108	0.098	0.074

表 12. mAb1901 人源化抗体结合活性

抗体	Emax	EC50 (nM)
IMAB362	1.115	0.086
h1901-2	1.039	0.076
h1901-3	1.1055	0.22
h1901-4	0.986	0.201
h1901-6	0.937	0.091
h1901-7	0.921	0.166
h1901-8	1.047	0.091
h1901-11	1.44	0.076
h1901-12	1.22	0.116

表 13. mAb1902 人源化抗体结合活性

抗体	Emax	EC50 (nM)
IMAB362	0.88	0.187
h1902-1	0.87	0.113
h1902-2	0.88	0.107
h1902-3	0.84	0.175
h1902-4	0.82	0.087
h1902-5	0.9	0.098
h1902-6	0.78	0.141
h1902-7	0.75	0.121
h1902-8	0.89	0.132
h1902-9	0.75	0.137
h1902-10	0.89	0.133

15

测试例 2: 抗体细胞水平结合实验
将稳转表达 Claudin18.2 的 NUGC4 细胞用 FACS 缓冲液(2%胎牛血清(Gibco,

10099141) pH7.4 PBS (Sigma, P4417-100TAB)) 制备成 1×10^6 /ml 的细胞悬液, 100 μ l/孔加入 96 孔圆底板 (Corning, 3795) 中。离心去除上清后加入 50 μ l/孔用 FACS 缓冲液稀释的不同浓度待测 Claudin18.2 抗体, 放于 4°C 冰箱中避光孵育 1 小时。以 FACS 缓冲液 300g 离心洗涤 3 次后, 加入工作浓度的 Alexa Fluor 488 包被的抗人 IgG (H+L) (invitrogen, A-11013), 放于 4°C 冰箱中避光孵育 40 分钟。以 FACS 缓冲液 300g 离心洗涤 3 次后, 在 BD FACS CantoII 流式细胞仪上检测几何平均数荧光强度, 计算 Claudin18.2 抗体对稳转表达 Claudin18.2 的 NUGC4 细胞的结合 EC50 值, 结果见图 1。

10 **测试例 3: 抗体内吞实验**

将预标记了 DyLight 488 NHS Ester (thermofisher, 46403) 的待测 Claudin18.2 抗体, 以 5 μ g/ml 终浓度加入 1×10^6 /ml 稳转表达 Claudin18.2 的 NUGC4 细胞中, 放于冰上避光孵育 1 小时, 以预冷的 FACS 缓冲液 (pH7.4 PBS, 2%胎牛血清) 离心洗涤 3 次, 去上清后加入预热的完全培养基, 放入 37°C 5% CO₂ 细胞培养箱。分别在 0、0.5、1、2、4 小时后取出细胞, 放置于冰上避光保存。待样品全部收集后, 300g 低温离心去除上清, 加入洗脱缓冲液 (pH1.7 0.05M 甘氨酸, 0.1M 氯化钠) 后, 室温孵育 7 分钟, 以 FACS 缓冲液 300g 离心洗涤 1 次, 在 BD FACS CantoII 流式细胞仪上检测几何平均数荧光强度, 计算 Claudin18.2 抗体对稳转表达 Claudin18.2 的 NUGC4 细胞的内吞效率。结果显示 (见图 2), 人源化抗体具有良好的细胞内吞效率。

测试例 4: 基于流式细胞技术测定抗体亲和力

实验当天收集 HEK293/hClaudin18.2 细胞于 U 底 96 孔板中, 每孔 1×10^5 至 2×10^5 个细胞。加入起始浓度 5 μ g/ml, $2 \times$ 梯度稀释 (12 个浓度点) 的 Claudin18.2 抗体, 4°C 孵育 1 小时, 阳性对照为 IMAB362, 同时设置不加抗体的阴性对照。离心去除抗体, 再加入 100 μ l/孔 FITC 抗人 IgG Fc 抗体 (200 $\times$), 4°C 避光孵育 30 分钟, 用 PBS+2%FBS 清洗两遍后准备进行流式细胞检测。启动 BD FACS CantoII, 预热完成后打开 BD FACSDiva 软件, 建立一个新的实验, 检测 HEK293/hClaudin18.2 阴性对照样品, 调节 FSC 及 SSC 电压至适当的数值并保存。根据 Quantum™ FITC-5 MESF Kit 说明书, 分别检测空白样品 B 及标准曲线 1, 调节 FITC 电压至适当的数值并保存。在保存的电压下检测 U 底 96 孔板中的样品, 记录数据。使用 Flowjo 软件分析实验数据得到 Geo Mean 数值, 根据 Quantum™ FITC-5 MESF Kit 说明书拟合 MESF-Geo Mean 标准曲线, 根据 FITC 抗人 IgG Fc 抗体的浓度荧光值计算出与 HEK293/hClaudin18.2 细胞结合的 Claudin18.2 抗体的摩尔浓度及游离抗体浓度, 利用 Scatchard 作图法计算抗体的 Bmax 和解离常数 KD。结果见表 14。

表 14. 人源化抗体细胞水平亲和力

抗体	IMAB362	h1901-11	h1902-5
KD (nM)	10.2	6.8	1.64

测试例 5：抗体的 ADCC 效应评价

消化各种 NUGC4 细胞（高中低表达 Claudin18.2），1000rpm 离心后，重悬计数。将细胞以 3×10^5 细胞/ml 的密度重悬在添加 10% FBS（新西兰超低 IgG 胎牛血清，Gibco，1921005PJ）的无酚红 RPMI 1640 中（Gibco，11835-030）。在 96 孔板（Corning，3903）中，每孔加入 25 μ l 细胞（7500 个/孔）。将抗体稀释在上述无酚红培养基中，配制成 3 $\times$ 的抗体稀释液，向细胞板中加入 25 μ l/孔的抗体。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 0.5 小时。

收集效应细胞（FcrR3A-V158-NFAT-RE-Jurkat 细胞），1000rpm 离心后，重悬计数。将细胞以 3×10^6 细胞/ml 的密度重悬在添加 10%FBS（新西兰超低 IgG 胎牛血清）的无酚红 RPMI 1640 中，在实验板中每孔加入 25 μ l 细胞（ 7.5×10^4 个细胞/孔）。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 6 小时。

向实验板的每个孔中加入 75 μ l/孔的 Bright-Glo（Promega，E2610），用酶标仪（PerkinElmer，VITOR3）检测化学发光（luminescence）。

结果显示（见表 15 和图 3A-图 3C），在低（图 3A）-中（图 3B）-高（图 3C）不同程度 Claudin18.2 表达的 NUGC4 细胞中，抗体 h1901-11 和 h1902-5 均显示出很强的 ADCC 活性。

表 15. 抗体在 Claudin18.2 不同表达程度的 NUGC4 细胞中的 ADCC 效应
单位 IC₅₀ (ng/ml)

Claudin18.2 表达程度	h1901-11	h1902-5	IMAB362
低表达	22.42	35.46	183.4
中等表达	15.35	30.00	210.4
高表达	26.17	32.16	132.6

20

测试例 6：ADC 分子细胞活性实验

本实验通过利用 CellTiter-Glo Luminescence Cell Viability Assay 检测 ADC 分子在体外对人胃癌细胞株的杀伤作用。第一天，收集 NUGC4-claudin18.2 低表达，NUGC4-claudin18.2 中表达，NUGC4-claudin18.2 高表达细胞，调整密度为 2.5×10^4 /ml，在 96 孔白色透明底板中加入 90 μ l/孔，约为 2500 个细胞每孔。37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培养箱过夜培养。第二天，在 U 底 96 孔板中稀释样品，起始浓度为 5 μ M，4 $\times$ 梯度稀释，9 个浓度点，向细胞板中加入 10 μ l/well 稀释好的样品。37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培养 6 天。第八天，取出细胞培养板，加入 50 μ l/well Cell Titer-Glo Reagent，室温放置 2 至 3 分钟，在 PHERAstar FS microplate reader 上读取 luminescence 数值。利用 GraphPad Prism 软件进行数据分析。见表 16。

30

表 16. ADC 体外细胞杀伤实验

ADC	NUGC4-claudin18.2 低表达细胞		NUGC4-claudin18.2 中表达细胞		NUGC4-claudin18.2 高表达细胞	
	EC50(nM)	E _{max}	EC50 (nM)	E _{max}	EC50(nM)	E _{max}
ADC-1	126.8	66.7	23.6	82.1	1.3	91.5
ADC-2	109.0	69.8	16.8	82.3	1.9	91.1
ADC-3	>500	49.0			94	78.7
ADC-4	299	61.03			12	84.97
ADC-5	142	69.91			3.5	95.89
ADC-6	>500	45.22			11	78.00
ADC-7	284	61.09			3.9	88.51
ADC-8	154	66.74			1.3	97.15

测试例 7: ADC 分子体内药效评价

Balb/c 裸在右肋部皮下接种人胃癌细胞 NUGC4(Claudin18.2 中等表达)细胞
5 (5×10⁶ 含 50% matrigel 基质胶/只), 第 0 日分组, 8 只/组, 共 8 组。平均瘤体
积约 84.41mm³。

ADC 腹腔注射, 共给药 3 次, 每只按体重注射 10g/0.1ml, 分别于第 0 日, 4
日, 11 日给药。

分组当天 ADC 腹腔注射, 共给药 4 次, 间隔 5 天给药, 每只按体重注射
10 10g/0.1ml。

每周测量 2 次瘤体积和体重, 记录数据。

使用 Excel 2003 统计软件: 平均值以 avg 计算; SD 值以 STDEV 计算; SEM
值以 STDEV/SQRT 计算; 组间差异 P 值以 TTEST 计算。

肿瘤体积 (V) 计算公式为: $V = 1/2 \times L_{\text{长}} \times L_{\text{短}}^2$

15 相对体积 (RTV) = VT/V0

抑瘤率(%)=(CRTV-TRTV)/CRTV(%)

其中 V0、VT 分别为实验开始时 (首次给药当天为第 0 天) 及实验结束时的
肿瘤体积。CRTV、TRTV 分别为实验结束时的空白对照组(Vehicle)及实验组的相
对肿瘤体积。结果见表 17 和图 4、图 5。

20 表17. ADC抑瘤实验结果

分组	平均肿瘤体积 (mm ³)		平均肿瘤体积 (mm ³)		相对肿瘤体积		%抑瘤率 D32
	D0	SEM	D32	SEM	D0	SEM	
空白对照组	83.33	0.82	2067.0	102.24	24.83	1.27	-
ADC-2 10mpk	83.93	1.65	263.13	44.17	3.11	0.51	87.47%**
ADC-2 3mpk	84.35	1.83	328.95	45.04	3.86	0.48	84.45%**
ADC-1 10mpk	83.60	1.61	123.80	20.99	1.48	0.25	94.04%**
ADC-1 3mpk	86.84	1.91	356.41	55.18	4.06	0.58	83.65%**

vs 空白对照组: **p<0.01。

二、制剂

制剂制备与检测过程中使用的设备及结果计算方法如下：

SEC 分子排阻色谱法：

- 5 根据凝胶孔隙的孔径大小与高分子样品分子的线团尺寸间的相对关系而对溶质进行分离的分析的方法。

SEC% (SEC单体含量百分比) = A单体/A总*100% (A单体为样品中主峰单体的峰面积, A总为所有峰面积之和)。

- 10 SEC测定用仪器：安捷伦1260；柱子：waters, XBrige BEH200Å SEC(300×7.8mm 3.5μm)。

CE 毛细管凝胶电泳：

将凝胶移到毛细管中作为支持介质进行的一种电泳，并在一定的电压下根据样品分子量的大小进行分离的方法。

- 15 还原CE纯度百分比=A主峰/A总*100% (A主峰为样品中轻链主峰+重链主峰的峰面积, A总为所有峰面积之和)。

CE测定用仪器：Beckman型号plus800。

渗透压测定：

- 20 冰点法测定渗透压，以冰点下降值与溶液的摩尔浓度成正比例关系为基础，采用高灵敏度感温元件，测定溶液结冰点，通过电量转化为渗透压。仪器厂家罗泽Loser，型号OM815。

蛋白浓度测定：

因为抗体药物偶联物中的药物在280 nm下有吸收，用以下公式对蛋白浓度进行校正，

- 25
$$A_{280} = C_d * \epsilon_{280d} + C_{mab} * \epsilon_{280mab};$$
$$A_{370} = C_d * \epsilon_{370d};$$

- 30 C_d 代表药物的浓度， C_{mab} 代表蛋白的浓度， ϵ_{280d} 代表药物在280 nm下的消光系数， ϵ_{280mab} 代表蛋白在280 nm下的消光系数， ϵ_{370d} 代表药物在370 nm下的消光系数。 $\epsilon_{280mab} = 1.49 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mL}$ ， $\epsilon_{280d} = 5000$ (280 nm药物摩尔消光系数) / 1074.13 (药物分子量) = $4.65 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mL}$ ， $\epsilon_{370d} = 19000$ (370 nm药物摩尔消光系数) / 1074.13 (药物分子量) = $17.69 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mL}$ ，以上消光系数为质量消光系数。

蛋白浓度测定仪器：紫外可见分光光度计，型号：Nano Drop oneC，光程为1mm。

实施例 2-1：制剂缓冲体系与 pH 值的筛选

- 35 配制含有 20 mg/mL (蛋白浓度) 的 ADC-9 和以下不同缓冲体系，以及 0.1mg/mL 聚山梨酯 80 (PS80) 的制剂。

- 1) 10 mM 柠檬酸-柠檬酸钠 (CA), pH 5.5
 2) 10 mM 琥珀酸-琥珀酸钠 (SA), pH 5.0
 3) 10 mM 琥珀酸-琥珀酸钠, pH 5.5
 4) 10 mM 组氨酸盐酸盐 (His-HCl), pH 5.5
 5) 10 mM 组氨酸盐酸盐, pH 6.0
 6) 10 mM 组氨酸盐酸盐, pH 6.5
 7) 10 mM 组氨酸-醋酸盐 (His-AA), pH 5.0
 8) 10 mM 组氨酸-醋酸盐, pH 5.5
 9) 10 mM 磷酸盐 (PB), pH 6.5。
- 10 将每种制剂过滤, 灌装, 加塞, 轧盖, 取样品进行高温稳定性 (40°C)、振摇 (25°C, 300 rpm) 研究, 考察外观、SEC、还原 CE。结果见表 18。
- 振摇 11 天后, 只有 2)、3)、7)、9) 号样品外观澄明; 40°C 放置 15 天后, 1)、2)、3)、7)、8) 号样品外观澄明。即从外观的角度看, 2)、3)、7) 号样品的制剂较优。
- 15 40°C 放置 15 天后, 采用 SEC 检测样品, 结果显示: 4)、5)、6)、7)、8) 号样品的单体降低幅度在 4% 左右; 其他制剂单体降低幅度为 7%-10%。
- 40°C 放置 15 天后, 采用还原 CE 检测样品, 结果显示: 4)、5)、7)、8) 号样品的主峰下降幅度在 1%-2% 左右, 优于其他样品。
- 综合以上数据, 7) 号样品即 10 mM His-AA, pH 5.0 制剂从外观及各化学检测项均优于其余制剂, 因此选择 10mM His-AA, pH 5.0 为最终缓冲液。
- 20

表 18. pH 和缓冲液稳定性结果

编号	缓冲液及 pH	放置条件	外观	SEC % 单体	Δ 单体	还原 CE %	Δ 主峰
1	10mM CA, pH 5.5	D0	澄明	94.4	N/A	98.5	N/A
		振摇 D11	澄明, 偶见颗粒	92.0	-2.4	98.6	0.1
		40°C D15	澄明	83.5	-10.9	94.5	-4.0
2	10mM SA, pH 5.0	D0	澄明	95.1	N/A	98.4	N/A
		振摇 D11	澄明	93.7	-1.4	98.8	0.5
		40°C D15	澄明	87.7	-7.4	94.0	-4.3
3	10mM SA, pH 5.5	D0	澄明	94.4	N/A	98.1	N/A
		振摇 D11	澄明	92.3	-2.1	98.4	0.3
		40°C D15	澄明	87.2	-7.2	94.9	-3.1
4	10mM His-HCl, pH 5.5	D0	微乳光	94.6	N/A	98.2	N/A
		振摇 D11	微乳光, 含有颗粒+	93.9	-0.7	97.7	-0.5
		40°C D15	澄明, 偶见颗粒	90.7	-3.9	96.9	-1.2
5	10mM His-HCl,	D0	澄明	94.1	N/A	98.0	N/A
		振摇 D11	细小颗粒+++	92.8	-1.3	97.1	-0.8

	pH 6.0	40°C D15	少量细小颗粒	90.1	-4.1	96.3	-1.6
6	10mM His-HCl, pH 6.5	D0	有乳光	93.5	N/A	98.2	N/A
		振摇 D11	乳光++, 细小颗粒+++	91.5	-2.0	96.3	-1.9
		40°C D15	颗粒沉底	88.8	-4.7	94.7	-3.5
7	10mM His-AA, pH 5.0	D0	澄明	95.5	N/A	98.4	N/A
		振摇 D11	澄明	95.2	-0.4	99.0	0.6
		40°C D15	澄明	91.6	-4.0	96.4	-2.0
8	10mM His-AA, pH 5.5	D0	微乳光	94.8	N/A	98.4	N/A
		振摇 D11	澄明, 偶见颗粒	93.8	-1.0	98.3	-0.1
		40°C D15	澄明	90.9	-3.9	96.6	-1.8
9	10mM PB, pH 6.5	D0	澄明	91.9	N/A	97.4	N/A
		振摇 D11	澄明	87.2	-4.7	98.0	0.6
		40°C D15	少量细小颗粒	83.6	-8.3	93.7	-3.7

注：表中“D”表示天，例如D3表示3天，以此类推；D0表示实验开始时，下同。

实施例 2-2：表面活性剂种类及浓度筛选

制备含有不同型号和浓度聚山梨酯，且含有 10mM His-AA，pH 5.0 的缓冲液、
5 80 mg/mL 蔗糖和蛋白浓度为 20 mg/mL 的 ADC-9 的制剂。将每种制剂过滤，灌装，加塞，轧盖。将样品进行高温稳定性研究（40°C）和冻融研究。其中冻融研究为冻融 5 次循环（FT5C，35°C-2 至 8°C）后室温放置三天（25°C D3），考察外观、SEC、还原 CE，具体制剂设计见表 19。

结果见表 20，实验结果显示采用 0.2 mg/ml PS80 的制剂在各条件下外观和化
10 学检测项为最优。

综合以上结果，表面活性剂种类及浓度定为 0.2mg/ml PS80。

表 19. 聚山梨酯种类及浓度筛选制剂

剂型	聚山梨酯	Buffer	ADC 蛋白浓度
溶液剂	PS80 0.2 mg/mL	10mM His-AA, pH 5.0+ 80 mg/mL 蔗糖	20 mg/mL
	PS80 0.4 mg/mL		
	PS20 0.2 mg/mL		
	PS20 0.4 mg/mL		

注：PS20表示聚山梨酯20。

表 20. 聚山梨酯种类筛选结果

聚山梨酯种类	条件	外观	SEC%	还原 CE%
PS80 0.2 mg/mL	D0	澄明	95.5	98.6
	FT5C+25°C D3	澄明	95.8	97.9
	40°C M1	澄明	89.2	93.4
PS80 0.4 mg/mL	D0	澄明	95.5	98.3
	FT5C+25°C D3	少量霾状颗粒	95.8	98.6

	40°C M1	细小颗粒	86.4	89.9
PS20 0.2 mg/mL	D0	澄明	95.7	98.1
	FT5C+25°C D3	少量霉状颗粒	95.9	98.2
	40°C M1	细小颗粒	88.4	91.7
PS20 0.4 mg/mL	D0	澄明	95.7	98.6
	FT5C+25°C D3	澄明	95.5	97.0
	40°C M1	颗粒沉底	89.6	92.9

备注：表中“M”表示月，M1表示1个月，以此类推，下同。

实施例 2-3：糖种类筛选

制备分别含有蔗糖、海藻糖、甘露醇的制剂，其还含有 10mM His-AA (pH 5.0) 缓冲液、0.2 mg/mL PS80 和 20 mg/mL（蛋白浓度）的 ADC-9。将每种制剂过滤，灌装，加塞，轧盖。将样品进行高温稳定性研究（40°C）、-35°C/4°C 冻融循环并在室温放置 3 天研究，考察外观、SEC、还原 CE。

结果见表 21。在不同糖种类制剂冻融条件下，采用蔗糖的样品的外观优于采用海藻糖或甘露醇的样品。SEC 检测结果显示，采用蔗糖或海藻糖的样品优于甘露醇；40°C 放置一个月后，采用蔗糖的样品的外观优于采用海藻糖或甘露醇的样品，SEC 和还原 CE 的检测结果显示采用蔗糖的样品略优于采用海藻糖的样品。

表 21. 糖种类溶液剂筛选结果

糖浓度	条件	外观	SEC%	还原 CE %
80 mg/mL 蔗糖	D0	澄明	95.5	98.6
	FT5C+25°C D3	澄明	95.8	97.9
	40°C M1	澄明	89.2	93.4
80 mg/mL 海藻糖	D0	澄明	95.5	97.7
	FT5C+25°C D3	澄明	95.2	98.0
	40°C M1	细小颗粒	88.0	91.8
50 mg/mL 甘露醇	D0	澄明	95.0	98.6
	FT5C+25°C D3	少量霉状颗粒	89.5	98.6
	40°C M1	细小颗粒	88.4	92.9

制备分别含有蔗糖、海藻糖、甘露醇的制剂，其还含有 10mM His-AA (pH 5.0) 缓冲液、0.2 mg/mL PS80 和 20 mg/mL（蛋白浓度）的 ADC-9。将每种制剂过滤、灌装、半加塞、冻干、加塞、轧盖，放置高温稳定性研究（40°C）考察外观、SEC、还原 CE。冻干工艺参见表 22 的冻干工艺参数 1。

表 22. 冻干工艺参数 1

冻干工艺参数	设定温度 (°C)	设定时间 (min)	保持时间 (h)	真空度 (Pa)
预冻	5	10	1	N/A
预冻	-45	50	2.5	N/A

一次干燥	-20	120	45	20
二次干燥	25	60	8	1

40℃ 放置一个月后，SEC 的检测结果（见表 23）显示采用蔗糖的样品略优于采用海藻糖的样品，更优于采用甘露醇的样品，还原 CE 的检测结果（见表 23）显示，采用蔗糖的样品和采用海藻糖的样品相当，同时优于采用甘露醇的样品。

5

表 23. 糖种类冻干剂筛选结果

糖浓度	放置条件	SEC%	还原 CE %
80 mg/mL 蔗糖	冻干前	96.2	98.8
	40℃ M1	95.9	98.63
80 mg/mL 海藻糖	冻干前	96.1	98.76
	40℃ M1	95.1	98.89
50 mg/mL 甘露醇	冻干前	96.0	98.79
	40℃ M1	89.9	97.37

实施例 2-4：冻干后样品外观优化实验

按照 10mM His-AA，pH 5.0、80 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL PS80 和 20 mg/mL（蛋白浓度）ADC-9 配制原液，过滤灌装后按照冻干工艺参数 1 冻干（见表 22），考察冻干后样品外观。冻干样品为表面平整白色粉饼，但粉饼底部边缘略有缩小。

将样品的糖浓度进一步下调至 60 mg/mL，按照 10mM His-AA，pH5.0、60 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL PS80 和 20mg/mL（蛋白浓度）ADC-9 配制原液，过滤灌装后按照表 22 的冻干工艺参数 1 冻干。冻干后，粉饼表面平整无皱缩，粉饼底部边缘略有缩底。

将糖浓度降至 40 mg/ml，但此时成品渗透压过低，在临床给药时有渗透压偏低的风险，为了保证成品渗透压，将缓冲液离子强度提高至 30 mM。按照 30 mM His-AA，pH 5.0、40 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL PS80 和 20 mg/mL（蛋白浓度）ADC-9 配制原液，过滤灌装后继续按照冻干工艺参数 1 冻干。冻干后样品粉饼表面平整无塌陷，粉饼底部边缘完整。

三种制剂的结果见表 24。

表 24. 冻干后样品外观

制剂	冻干后外观
10mM His-AA pH5.0、80mg/mL 蔗糖、0.2mg/mL PS80 和 20mg/mL（蛋白浓度）ADC-9	粉饼表面平整，底部边缘收缩
10mM His-AA pH5.0、60mg/mL 蔗糖、0.2mg/mL PS80 和 20mg/mL（蛋白浓度）ADC-9	粉饼表面平整，底部边缘略有收缩

30mM His-AA pH5.0、 40mg/mL 蔗糖、0.2mg/mL PS80 和 20mg/mL (蛋白浓度) ADC-9	粉饼表面平整，底部边缘完整
--	---------------

实施例 2-5：冻干后样品稳定性

按照表 25 中的制剂配制原液，过滤灌装后按照冻干工艺参数 1 冻干(见表 22)，将冻干后样品于 40°C M1 条件下放置后复溶检测其稳定性变化。

- 5 稳定性结果显示见表 25，3 号制剂的冻干样品在 40°C M1 条件下还原 CE 下降约 3.7%，其余两制剂各化学检测项均无明显变化，稳定性明显优于 3 号制剂。2 号制剂冻干前原液的 pH 为 5.04，冻干后复溶溶液的 pH 为 5.27。

表 25. 制剂稳定性结果

编号	制剂	放置条件	SEC% 单体	还原 CE %	复溶后外 观
1	10mM His-AA pH5.0、80mg/mL 蔗糖、0.2mg/mL PS80 和 20mg/mL (蛋白浓度) ADC-9	冻干前	96.2	98.8	N/A
		冻干后复溶	96.0	98.3	澄明
		40°C M1	95.9	98.6	N/A
2	30mM His-AA pH5.0、40mg/mL 蔗糖、0.2mg/mL PS80 和 20mg/mL (蛋白浓度) ADC-9	冻干前	98.2	98.8	N/A
		冻干后复溶	N/A	N/A	澄明
		40°C M1	98.0	98.3	N/A
3	10mM SA pH5.0、80mg/ml 蔗糖、0.4mg/mL PS80 和 20mg/mL (蛋白浓度) ADC-9	冻干前	95.3	98.73	N/A
		冻干后复溶	95.3	98.29	澄明
		40°C M1	95.1	95.06	N/A

10 **实施例 2-6：冻干制剂溶液剂稳定性**

按照表 26 中的制剂制备制剂，过滤，灌装，加塞，轧盖后进行-35°C/4°C 冻融循环并在室温放置 3 天研究，振摇 11 天研究和高温稳定性研究（40°C），考察对应条件下样品外观，SEC 和还原 CE 变化。

- 15 稳定性结果显示见表 26，在降低蔗糖浓度和提高缓冲液离子强度后，2 号制剂在外观和纯度项变化上与 1 号制剂无明显差异，在高温条件下还原 CE 降幅略优于 1 号制剂。

表 26. 制剂稳定性结果

编号	制剂	放置条件	外观	SEC%	还原 CE %
1	10mM His-AA pH5.0、80mg/mL 蔗糖、0.2mg/mL PS80 和 20mg/mL (蛋白浓度) ADC-9	D0	澄明	95.5	98.6
		FT5C+25°C D3	澄明	95.8	97.9
		振摇 D11	澄明	95.1	98.5
		40°C M1	澄明	89.2	93.4
2	30mM His-AA pH5.0、40mg/mL 蔗糖、0.2mg/mL PS80 和 20mg/mL (蛋白浓度) ADC-9	D0	澄明	97.4	98.7
		FT5C+25°C D3	澄明	97.3	98.6
		振摇 D11	澄明	97.9	98.7
		40°C M1	澄明	92.4	96.2

权利要求书

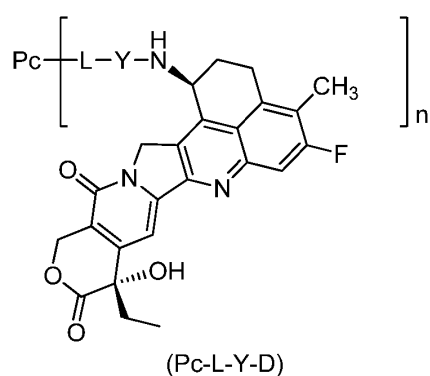
1. 一种药物组合物，包含抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物和缓冲剂，其中所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物中的抗 Claudin18.2 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

- 5 i) 所述重链可变区与如 SEQ ID NO: 5 所示的重链可变区具有相同氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含与如 SEQ ID NO: 6 所示的轻链可变区具有相同氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或
- 10 ii) 所述重链可变区与如 SEQ ID NO: 3 所示的重链可变区具有相同氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区与如 SEQ ID NO: 4 所示的轻链可变区具有相同氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；
- 所述缓冲剂是组氨酸盐缓冲剂，优选为组氨酸-醋酸盐缓冲剂。

2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中所述抗 Claudin18.2 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

- 15 iii) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或
- 20 iv) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；
- 优选地，所述抗 Claudin18.2 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：
- 25 v) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 31 所示和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 29 所示；或
- vi) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 26 所示和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 23 所示；
- 更优选地，所述抗 Claudin18.2 抗体包含：
- vii) SEQ ID NO: 49 所示的重链，和 SEQ ID NO: 47 所示的轻链；或
- 30 viii) SEQ ID NO: 44 所示的重链，和 SEQ ID NO: 41 所示的轻链。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物组合物，其中所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物具有如通式 (Pc-L-Y-D) 所示的结构：



其中：

Y 选自 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 、 $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$ 、 $-O-CR^1R^2-$ 、 $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 和 $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ；

- 5 R^a 和 R^b 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基、烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟烷基、环烷基和杂环基；
或者， R^a 和 R^b 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

R^1 选自卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基；

- 10 R^2 选自氢原子、卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基和杂芳基；

或者， R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

或者， R^a 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

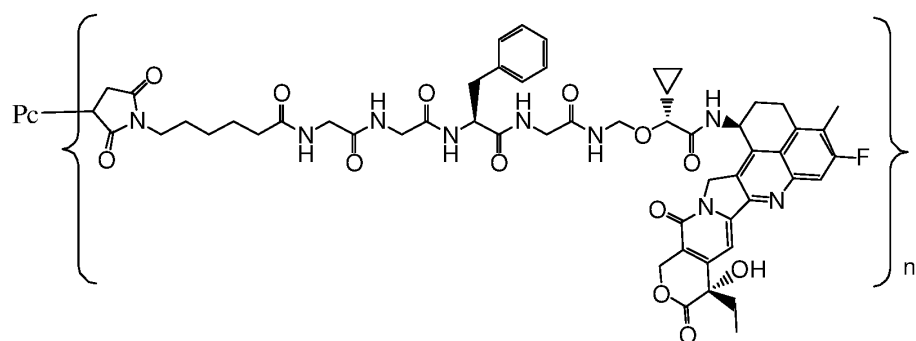
m 为 0 至 4 的整数；

- 15 n 为 1 至 10，n 是小数或整数；

L 为接头单元；

Pc 为抗 Claudin18.2 抗体；

优选地，所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物具有如下式所示的结构：



- 20 其中：

n 为 2 至 8，n 是小数或整数；

Pc 为抗 Claudin18.2 抗体。

4. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物还包含表面活性剂；
优选地，所述表面活性剂为聚山梨酯；
5 更优选地，所述表面活性剂为聚山梨酯 80 或聚山梨酯 20；
最优选地，所述表面活性剂为聚山梨酯 80。
5. 根据权利要求 4 所述的药物组合物，其中所述表面活性剂浓度为 0.05 mg/mL 至 0.5 mg/mL，优选为 0.1 mg/mL 至 0.2 mg/mL，更优选为 0.2 mg/mL。
- 10 6. 根据权利要求 1 至 5 任一项所述的药物组合物，其中所述组合物还含糖；
优选地，所述糖选自蔗糖、甘露醇和海藻糖；
更优选地，所述糖为蔗糖。
- 15 7. 根据权利要求 6 所述的药物组合物，其中所述糖浓度为 20 mg/mL 至 100 mg/mL，优选为 40 mg/mL 至 80 mg/mL，更优选为 40 mg/mL。
8. 根据权利要求 1 至 7 任一项所述的药物组合物，其中所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物浓度为以蛋白浓度计 1 mg/mL 至 100 mg/mL，优选为以蛋白浓度计
20 10 mg/mL 至 30 mg/mL，更优选为以蛋白浓度计 20 mg/mL。
9. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲剂的浓度为 5 mM 至 50 mM，优选为 10 mM 至 30 mM，更优选为 30 mM。
- 25 10. 根据权利要求 1 至 9 任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物的 pH 为 5.0-6.5，优选为 5.0-5.5，更优选为 5.0-5.3。
11. 根据权利要求 1 至 10 任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：
(a) 以蛋白浓度计 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联
30 物，(b) 0.1 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯，(c) 40 mg/mL 至 80 mg/mL 的糖，和
(d) 10 mM 至 30 mM 的组氨酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.0-5.5；
优选地，所述药物组合物包含如下组分：
(a) 以蛋白浓度计 20 mg/mL 的所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物，(b) 0.2
mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 40 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 30 mM 组氨酸-醋酸盐缓冲剂，
35 所述药物组合物的 pH 为 5.0-5.3。
12. 一种药物组合物，其包含：

以蛋白浓度计 20 mg/mL 的抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物、

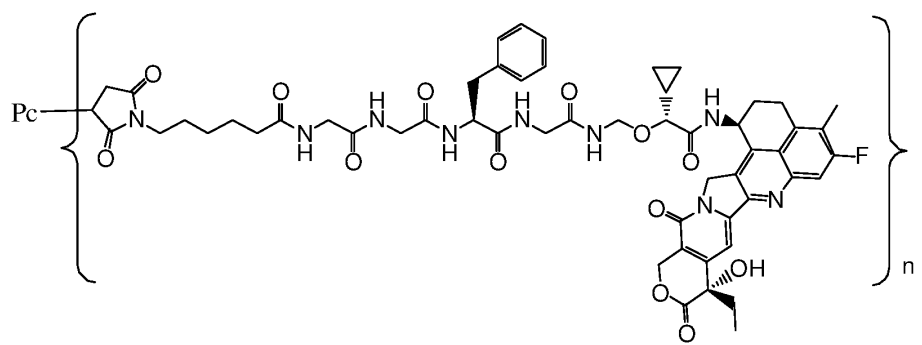
0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80、

40 mg/mL 的蔗糖、和

30 mM 组氨酸-醋酸盐缓冲剂；

5 所述药物组合物的 pH 为 5.0 至 5.3；

所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物具有如下式所示的结构：



其中：

n 为 2 至 8，n 是小数或整数；

10 Pc 为抗 Claudin18.2 抗体，其包含如 SEQ ID NO: 49 所示的重链，和如 SEQ ID NO: 47 所示的轻链。

13. 一种含抗体药物偶联物的冻干制剂，其特征在于所述制剂复溶后可形成权利要求 1 至 12 任一项所述的药物组合物。

15

14. 一种制备含抗体药物偶联物的冻干制剂的方法，其中包括将权利要求 1 至 12 中任一项所述的药物组合物进行冷冻干燥的步骤。

15. 一种含抗体药物偶联物的冻干制剂，所述制剂通过将权利要求 1 至 12 中任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得。

20

16. 一种含抗体药物偶联物的复溶溶液，其特征在于所述复溶溶液是通过将权利要求 13 或 15 所述的冻干制剂经复溶制备获得；

优选地，所述复溶溶液包含如下组分：

25 (a) 以蛋白浓度计 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物，(b) 0.1 mg/mL 至 0.2 mg/mL 的聚山梨酯，(c) 40 mg/mL 至 80 mg/mL 的糖，和 (d) 10 mM 至 30 mM 的组氨酸盐缓冲剂；所述复溶溶液的 pH 为约 5.0-5.5；

更优选地，所述药物组合物包含如下组分：

30 (a) 以蛋白浓度计 20 mg/mL 的所述抗 Claudin18.2 抗体药物偶联物，(b) 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 40 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 30 mM 组氨酸-醋酸盐缓冲剂，

所述复溶溶液的 pH 为 5.0-5.3。

17. 一种制品，其包括容器，该容器中装有如权利要求 1 至 12 任一项所述的药物组合物、权利要求 13 或 15 所述的冻干制剂或权利要求 16 所述的复溶溶液。

5

18. 一种治疗肿瘤或癌症的方法，包括给予受试者有效量的权利要求 1 至 12 任一项所述的药物组合物、或权利要求 13 或 15 所述的冻干制剂、或权利要求 16 所述的复溶溶液、或权利要求 17 所述制品；

其中，所述肿瘤或癌症优选选自：头和颈鳞状细胞癌、头和颈癌、脑癌、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、中枢神经系统癌、神经内分泌肿瘤、咽喉癌、鼻咽癌、食管癌、甲状腺癌、恶性胸膜间皮瘤、肺癌、乳腺癌、肝癌、肝细胞瘤、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、胃肠道癌、肠癌、结肠癌、结肠直肠癌、肾癌、透明细胞肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、皮肤癌、黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、骨癌、软骨肉瘤、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、骨髓异常增生综合征、库肯勃氏瘤、骨髓增生性肿瘤、鳞状细胞癌、尤因氏肉瘤、全身性轻链淀粉样变性和梅克尔细胞癌；

更优选地，所述淋巴瘤选自：何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤和淋巴浆细胞性淋巴瘤；所述肺癌选自：非小细胞肺癌和小细胞肺癌；所述白血病选自：慢性髓细胞样白血病、急性髓细胞样白血病、淋巴细胞白血病、成淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病和髓样细胞白血病。

20