(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118403182 A
(43)申请公布日 2024.07.30

(21)申请号 202410509070.3

(22)申请日 2020.12.11

(66)本国优先权数据
201911273041.7 2019.12.12 CN
202011060513.3 2020.09.30 CN

(62)分案原申请数据
202080077964.X 2020.12.11

(71)申请人 江苏恒瑞医药股份有限公司
地址 222047 江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号
申请人 上海恒瑞医药有限公司

(72)发明人 杨阳 许建烟 陶维康

(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2017.01)
A61K 31/4745(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61K 47/65(2017.01)
A61P 35/00(2006.01)

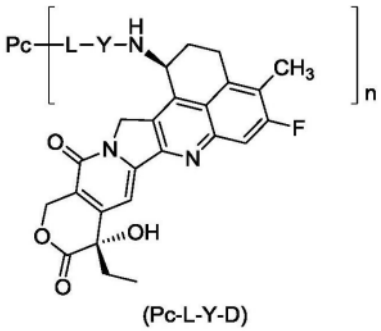
权利要求书8页 说明书58页
序列表（电子公布） 附图4页

(54)发明名称

抗密蛋白抗体药物偶联物及其医药用途

(57)摘要

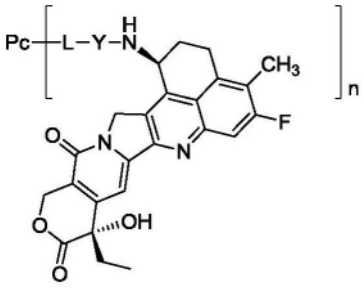
本披露涉及抗密蛋白抗体药物偶联物及其医药用途。具体而言,本披露涉及通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物,其中Pc为抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段,L、Y和n如说明书中所定义。



(Pc-L-Y-D)

CN 118403182 A

1.一种通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:



(Pc-L-Y-D)

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)-;

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;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与其相连的碳原子一起形成环烷基或杂环基;

m为0至4的整数;

n为1至10,n是小数或整数;

L为接头单元;

Pc为抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段。

2.根据权利要求1所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中:

i)所述重链可变区包含与如SEQ ID NO:3序列所示的重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含与如SEQ ID NO:4序列所示的轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3;或

ii)所述重链可变区包含与如SEQ ID NO:5序列所示的重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含与如SEQ ID NO:6序列所示的轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

3.根据权利要求1或2所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中:

iii)所述重链可变区包含序列分别如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序列分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3;或

iv)所述重链可变区包含序列分别如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序列分别如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19

和SEQ ID NO:20所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中:

(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%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%同一性;

(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%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%同一性;

(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%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%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%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%同一性。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,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源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;

优选地,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中的一个或更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中的一个或更多个氨基酸回复突变;或

(b)所述轻链可变区中包含任选自4L和22S中的一个或更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中的一个或更多个氨基酸回复突变;

优选地,所述框架区变体包含选自以下所述的突变:

(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。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段包含如下所示的重链可变区和轻链可变区:

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

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

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

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

优选地,所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段包含如下所示的重链可变区和轻链可变区:

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

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

8.根据权利要求1至7中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段包含抗体重链恒定区和轻链恒定区;

优选地,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;

更优选地,所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段包含序列如SEQ ID NO:7所示的重链恒定区和序列如SEQ ID NO:8所示的轻链恒定区;

最优选所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段包含:与如SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:42所示的重链具有至少90%序列同一性的重链,和与如SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:39所示的轻链具有至少90%序列同一性的轻链;或

与如SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:49所示的重链具有至少90%序列同一性的重链,和与如SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:46所示的轻链有至少90%序列同一性的轻链。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段,包含:

(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、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45所示的重链和序列如SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40或SEQ ID NO: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

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

10.根据权利要求1至9中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体选自:

h1901-11:包含氨基酸序列如SEQ ID NO:44所示的重链,和如SEQ ID NO:41所示的轻链;或

h1902-5:包含氨基酸序列如SEQ ID NO:49所示的重链,和如SEQ ID NO:47所示的轻链。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中n为2至8的小数或整数,优选为3.5至4.5的小数或整数。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,

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、卤素或烷基;

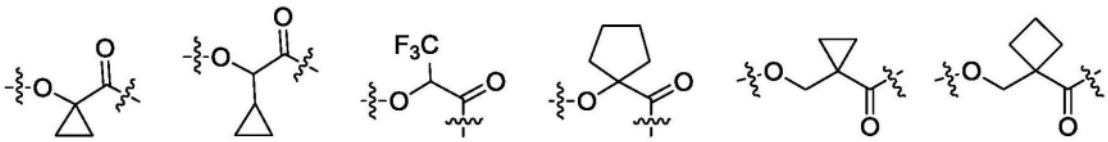
R^1为卤代烷基或C_{3-6}环烷基；

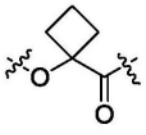
R^2选自氢原子、卤代烷基或C_{3-6}环烷基；

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。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中Y选自：





和 ；

其中Y的O端与接头单元L相连。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，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)-、$-CH_2-C(O)-NR^3-W-C(O)-$或-C(O)-W-C(O)-，其中W选自C_{1-8}烷基、C_{1-8}烷基-C_{3-6}环烷基和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和S的杂原子，其中所述的C_{1-8}烷基、C_{1-8}烷基-C_{3-6}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、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代；

L^2选自$-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)-$、$-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$、$-S(CH_2)p^1C(O)-$或化学键，其中$p^1$为1至20的整数；

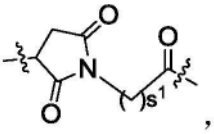
L^3为由2至7个氨基酸构成的肽残基，其中所述的氨基酸选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基，并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代；

L^4选自$-NR^5(CR^6R^7)_t-$、$-C(O)NR^5-$、$-C(O)NR^5(CH_2)_t-$和化学键，其中t为1至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、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基；

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

15.根据权利要求1至14中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中接头单元-L-为$-L^1-L^2-L^3-L^4-$，

L^1为，s^1为2至8的整数；

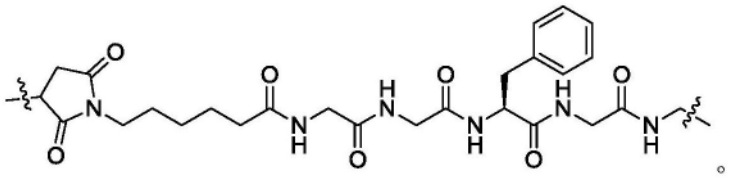
L^2为化学键；

L^3为四肽残基；优选为GGFG的四肽残基；

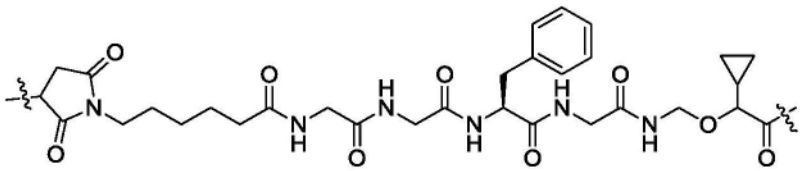
L^4为$-NR^5(CR^6R^7)t-$，R^5、R^6或R^7相同或不同，且各自独立地为氢原子或烷基，t为1或2；

其中L^1端与Pc相连,L^4端与Y相连。

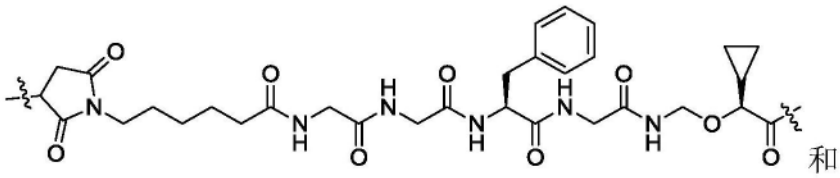
16.根据权利要求1至15中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中-L-为:

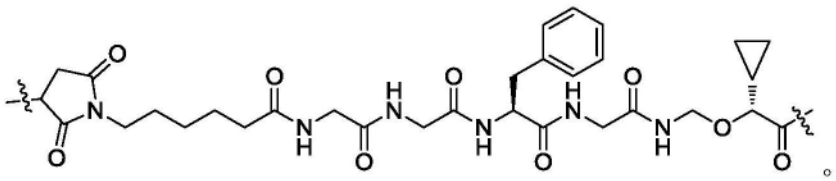


17.根据权利要求1至16中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中-L-Y-任选自:

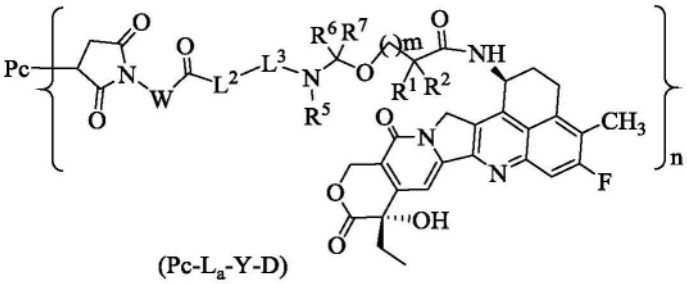


和





18.根据权利要求1至17中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其为通式(Pc-L_a-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:



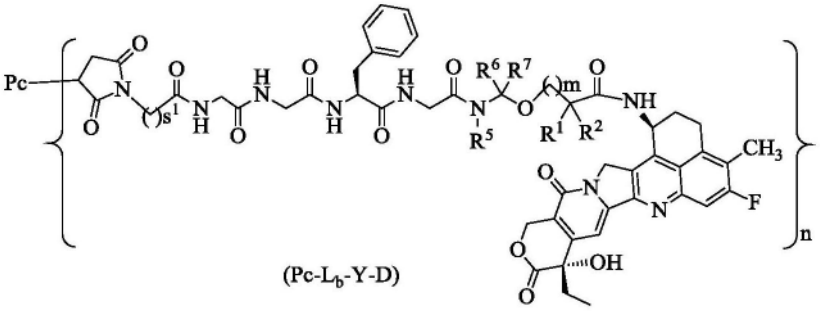
(Pc-L_a-Y-D)

其中:

W、L^2、L^3、R^5、R^6、R^7如权利要求14所定义;

Pc、n、R^1、R^2、m如权利要求1中所定义。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其为通式(Pc-L_b-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:

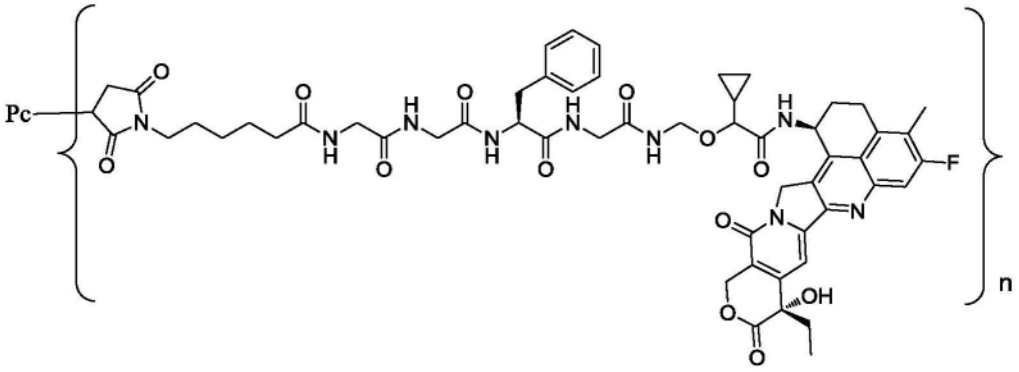


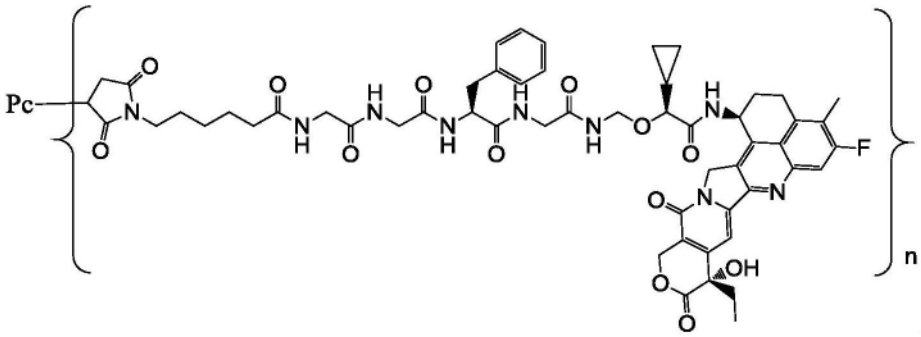
其中：

s^1为2至8的整数；

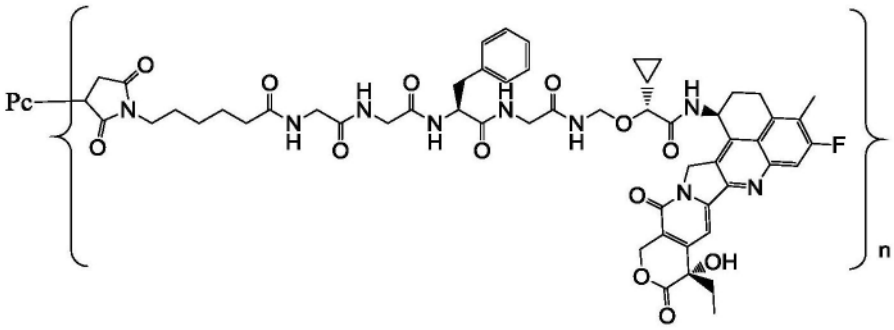
Pc、R^1、R^2、R^5～R^7、m和n如权利要求18中所定义。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,所述配体-药物偶联物选自：



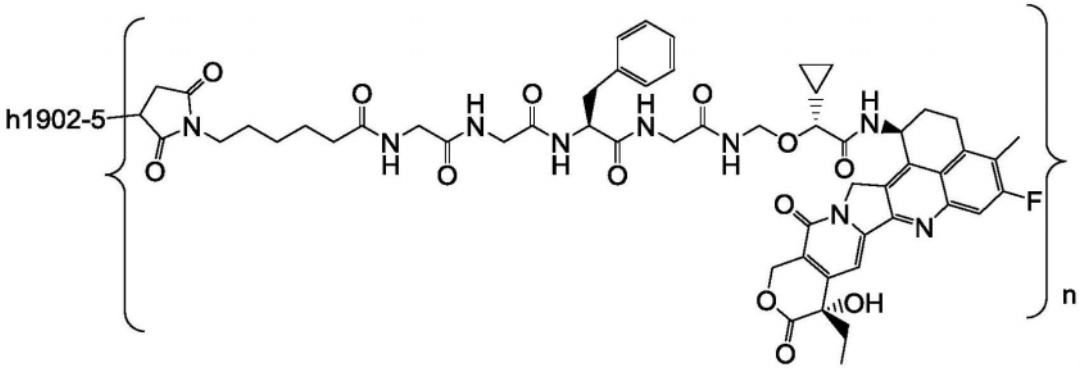


和

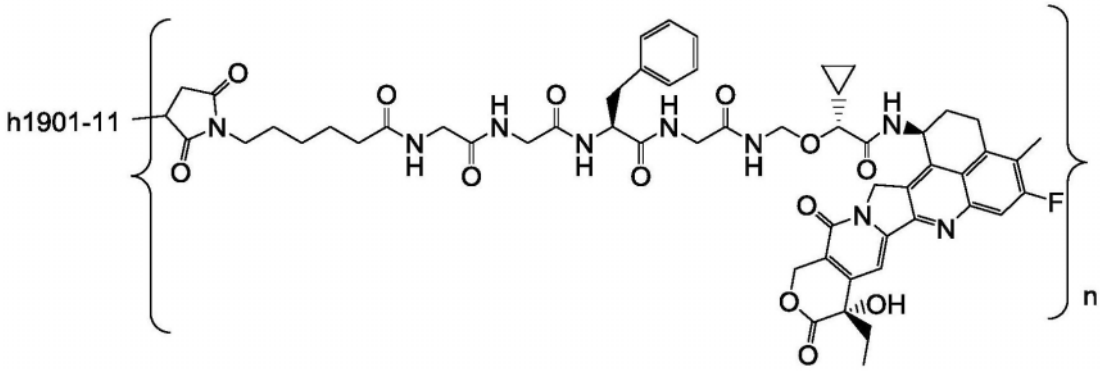


其中Pc和n如权利要求1中所定义。

21.根据权利要求1至20中任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,所述配体-药物偶联物选自：

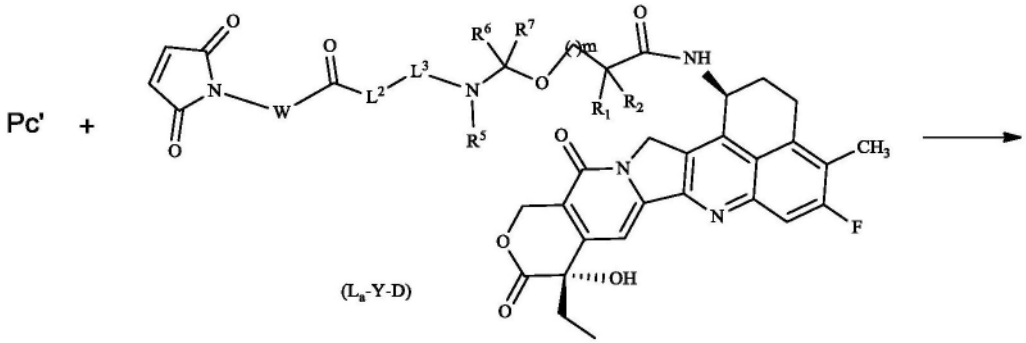


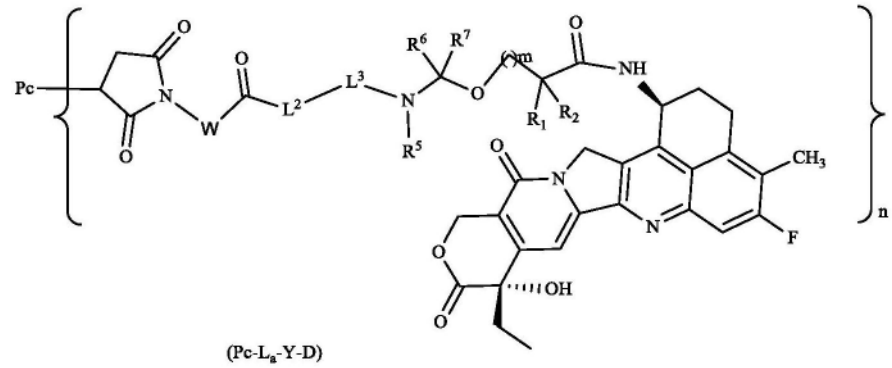
和



其中,n如权利要求1所定义;抗体h1902-5,h1901-11如权利要求10中定义。

22.一种制备如通式(Pc-L_a-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的方法,其包括以下步骤:





Pc'与通式(L_a-Y-D)所示的化合物进行偶联反应,得到通式(Pc-L_a-Y-D)所示的化合物;

其中:

Pc为抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段;Pc'为Pc经还原后所得;

W、L^2、L^3、R^1、R^2、R^5～R^7、m和n如权利要求18中所定义。

23.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至21中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

24.根据权利要求1至21中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或根据权利要求23所述的药物组合物,在制备用于治疗Claudin18.2介导的疾病或病症的药物中的用途。

25.根据权利要求24所述的用途,其中所述Claudin18.2介导的疾病或病症为Claudin18.2高表达癌症。

26.根据权利要求1至21中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或根据权利要求23所述的药物组合物在制备治疗和/或预防肿瘤和癌症的药物中的用途,其中所述肿瘤和癌症优选头和颈鳞状细胞癌、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;更优选的,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。

抗密蛋白抗体药物偶联物及其医药用途

[0001] 本申请是申请号为202080077964.X,申请日为2020年12月11日,发明名称为“抗密蛋白抗体药物偶联物及其医药用途”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2019年12月12日提交的中国专利申请(申请号CN201911273041.7)和2020年09月30日提交的中国专利申请(申请号CN202011060513.3)的优先权。

技术领域

[0003] 本披露涉及抗密蛋白抗体药物偶联物,尤其是抗Claudin18.2抗体-依喜替康类似物偶联物、其制备方法、包含抗体药物偶联物的药物组合物、及其用于制备治疗Claudin18.2介导的疾病或病症的药物中的用途;尤其在用于制备抗癌药物中的用途。

背景技术

[0004] 这里的陈述仅提供与本公开有关的背景信息,而不必然地构成现有技术。

[0005] 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。

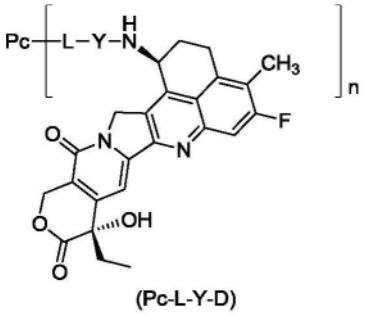
[0006] 抗体-药物偶联物(antibody drug conjugate,ADC)将单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的化学接头化合物与具有生物活性的细胞毒素相连,充分利用了抗体对正常细胞和肿瘤细胞表面抗原结合的特异性和细胞毒性物质的高效性,同时又避免了前者疗效偏低和后者毒副作用过大等缺陷。这也就意味着,与以往传统的化疗药物相比,抗体-药物偶联物能更精准地结合肿瘤细胞并降低将对正常细胞的影响。

[0007] 目前已有靶向Claudin18.2的抗体及ADC药物的专利报道,如WO2020200196A1、WO2016166122和WO2016165762。但是,目前仍需要开发更有效且更具安全性的抗Claudin18.2抗体-药物偶联物,以更好地用于Claudin18.2相关肿瘤的治疗。

发明内容

[0008] 本披露涉及抗Claudin18.2抗体的ADC及其用途,其中提供与抗Claudin18.2抗体或抗原结合片段与细胞毒性物质依喜替康类似物偶联的ADC药物。

[0009] 因此,本披露的目的为提供一种通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:

[0010] 

(Pc-L-Y-D)

[0011] 其中:

[0012] 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)-;

[0013] 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;

[0014] 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;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;

[0015] 或者,R^a和R^2与其相连的碳原子一起形成环烷基或杂环基;

[0016] m为0至4的整数;

[0017] n为1至10,n是小数或整数;

[0018] L为接头单元;

[0019] Pc为抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段。

[0020] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0021] i)所述重链可变区包含与如SEQ ID NO:3序列所示的重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含与如SEQ ID NO:4序列所示的轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3;或

[0022] ii)所述重链可变区包含与如SEQ ID NO:5序列所示的重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含与如SEQ ID NO:6序列所示的轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0023] 在本公开的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0024] iii)所述重链可变区包含序列分别如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序列分别如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3;或

[0025] iv)所述重链可变区包含序列分别如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序列分别如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0026] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

[0027] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0028] (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%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%同一性;

[0029] (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%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%同一性;

[0030] (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%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%同一性;或

[0031] (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%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%同一性。

[0032] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,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源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(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10)氨基酸的回复突变;

[0033] 优选地,所述框架区变体包含选自以下(a)或(b)所述的突变:

[0034] (a)所述轻链可变区中包含任选自22S、85I和87H中的一个或更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中的一个或更多个氨基酸回复突变;或

[0035] (b)所述轻链可变区中包含任选自4L或22S一个或更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中的一个或更多个氨基酸回复突变;

[0036] 优选地,所述框架区变体包含选自以下所述的突变:

[0037] (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

[0038] (b-1)所述轻链可变区中包含选自4L的氨基酸回复突变。

[0039] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段包含如下所示的重链可变区和轻链可变区:

[0040] (vii)所述重链可变区序列如SEQ ID NO:3所示和所述轻链可变区序列如SEQ ID NO:4所示;

[0041] (viii)所述重链可变区序列如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27所示和所述轻链可变区序列如SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23所示;

[0042] (ix)所述重链可变区序列如SEQ ID NO:5所示和所述轻链可变区序列如SEQ ID

NO:6所示;或

[0043] (x)所述重链可变区序列如SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34所示和所述轻链可变区序列如SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30所示;

[0044] 优选地,所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段包含如下所示的重链可变区和轻链可变区:

[0045] (xi)所述重链可变区序列如SEQ ID NO:31所示和所述轻链可变区序列如SEQ ID NO:29所示;或

[0046] (xii)所述重链可变区序列如SEQ ID NO:26所示和所述轻链可变区序列如SEQ ID NO:23所示。

[0047] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段,包含抗体重链恒定区和轻链恒定区;优选地,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;更优选地,所述抗体包含序列如SEQ ID NO:7所示的重链恒定区和序列如SEQ ID NO:8所示的轻链恒定区;最优选所述抗体包含:与具有SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:42所示氨基酸序列的重链具有至少90%同一性的重链,和与具有SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:39所示氨基酸序列的轻链有至少90%同一性的轻链;或

[0048] 与具有SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:49所示氨基酸序列的重链具有至少90%同一性的重链,和与具有SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:46所示氨基酸序列的轻链有至少90%同一性的轻链。

[0049] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段,包含:

[0050] (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;

[0051] (d)序列如SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45所示的重链和序列如SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:41所示的轻链;

[0052] (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

[0053] (f)序列如SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:52所示的重链和序列如SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48所示的轻链。

[0054] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中所述抗Claudin18.2抗体选自:

[0055] h1901-11:包含氨基酸序列如SEQ ID NO:44所示的重链,和序列如SEQ ID NO:41所示的轻链;或

[0056] h1902-5:包含氨基酸序列如SEQ ID NO:49所示的重链,和序列如SEQ ID NO:47所示的轻链。

[0057] 在本披露的一些实施方案中,所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')2、单链抗体(scFv)、二聚化的V区(双抗体)和二硫键稳定化的V区(dsFv)。

[0058] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中n可以为1-10之间的整数或小数,n可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的均值。n为2至8的小数或整数,优选为3至8的小数或整数,更优选为5至9的

小数或整数,或优选为2至7的小数或整数。在一些实施方案中,n为3.5至4.5的小数或整数。

[0059] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,

[0060] 其中:

[0061] Y为-O-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-;

[0062] R^a和R^b相同或不同,且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素或烷基;

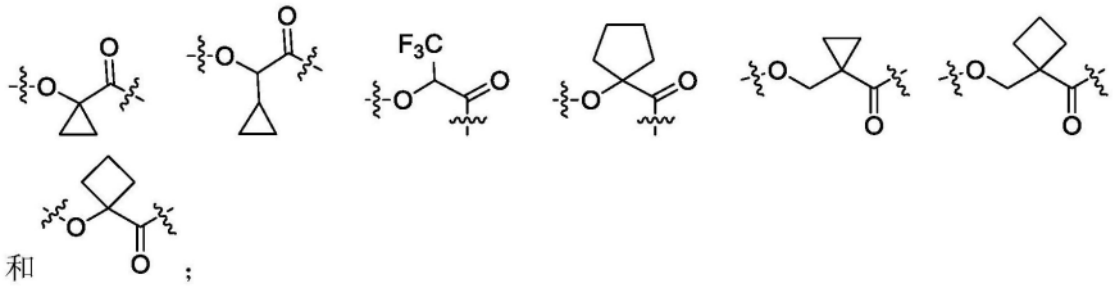
[0063] R^1为卤代烷基或C_{3-6}环烷基;

[0064] R^2选自氢原子、卤代烷基或C_{3-6}环烷基;

[0065] 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;

[0066] m为0或1。

[0067] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中Y选自:

[0068] 

和 ;

[0069] 其中Y的O端与接头单元L相连。

[0070] 在本披露的一些实施方案中,提供的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中接头单元-L-为-L^1-L^2-L^3-L^4-。

[0071] 在一些实施方案中,L^1选自-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-W-C(O)-、-CH_2-C(O)-NR^3-W-C(O)-或-C(O)-W-C(O)-,其中W选自C_{1-8}烷基、C_{1-8}烷基-C_{3-6}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-C_{3-6}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、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代。

[0072] 在一些实施方案中,L^2选自-NR^4(CH_2CH_2O)$p^1CH_2CH_2C$(O)-、-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-、-S(CH_2)p^1C(O)-或化学键,其中p^1为1至20的整数。

[0073] 在一些实施方案中,L^3为由2至7个氨基酸构成的肽残基,其中所述的氨基酸选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、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、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代。

[0074] 在一些实施方案中,L^4选自-NR^5(CR^6R^7)$_t$-、-C(O)NR^5-、-C(O)NR^5(CH_2)$_t$-或化学键,其中t为1至6的整数。

[0075] 在一些实施方案中,R^3、R^4和R^5相同或不同,且各自独立地选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基。

[0076] 在一些实施方案中,R^6和R^7相同或不同,且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基。

[0077] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药

物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中接头单元-L-为-L^1-L^2-L^3-L^4-,

[0078] L^1选自-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-W-C(O)-、-CH_2-C(O)-NR^3-W-C(O)-或-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、环烷基和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、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代;

[0079] L^2选自-$NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)$-、-$NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)$-、-$S(CH_2)p^1C(O)$-或化学键,其中$p^1$为1至20的整数;

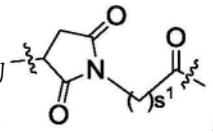
[0080] L^3为由2至7个氨基酸构成的肽残基,其中所述的氨基酸选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基,并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代;

[0081] L^4选自-$NR^5(CR^6R^7)_t$-、-$C(O)NR^5$-、-$C(O)NR^5(CH_2)_t$-或化学键,其中t为1至6的整数;

[0082] R^3、R^4和R^5相同或不同,且各自独立地选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

[0083] R^6和R^7相同或不同,且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基。

[0084] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中接头单元-L-为-L^1-L^2-L^3-L^4-,

[0085] L^1为,s^1为2至8的整数;

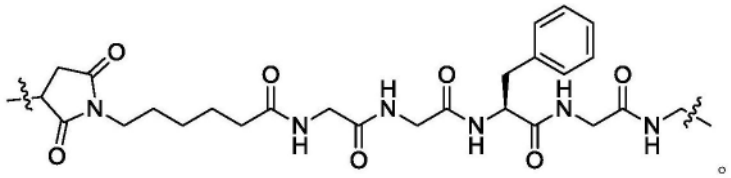
[0086] L^2为化学键;

[0087] L^3为四肽残基;优选的,L^3为GGFG的四肽残基(SEQ ID No.55);

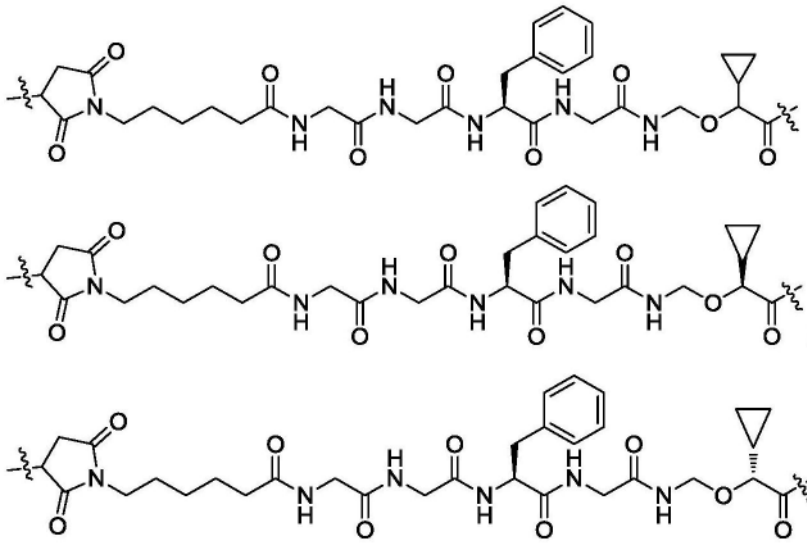
[0088] L^4为-$NR^5(CR^6R^7)t$-,R^5、R^6或R^7相同或不同,且各自独立地为氢原子或烷基,t为1或2;

[0089] 其中所述的L^1端与Pc相连,L^4端与Y相连。

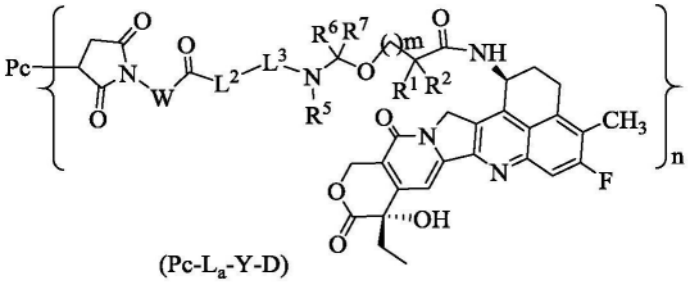
[0090] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中-L-为:

[0091] 。

[0092] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中-L-Y-任选自:

[0093] 
和

[0094] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其为通式(Pc-L_a-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:

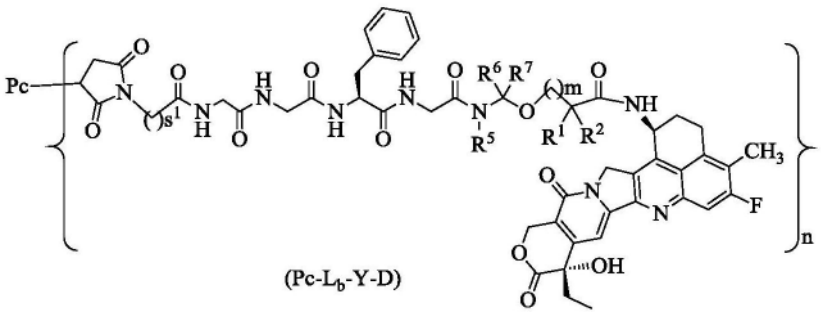
[0095] 
(Pc-L_a-Y-D)

[0096] 其中:

[0097] W、L^2、L^3、R^5、R^6、R^7如前所述接头单元-L-中所定义;

[0098] Pc、n、R^1、R^2、m如通式(Pc-L-Y-D)中所定义。

[0099] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其为通式(Pc-L_b-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:

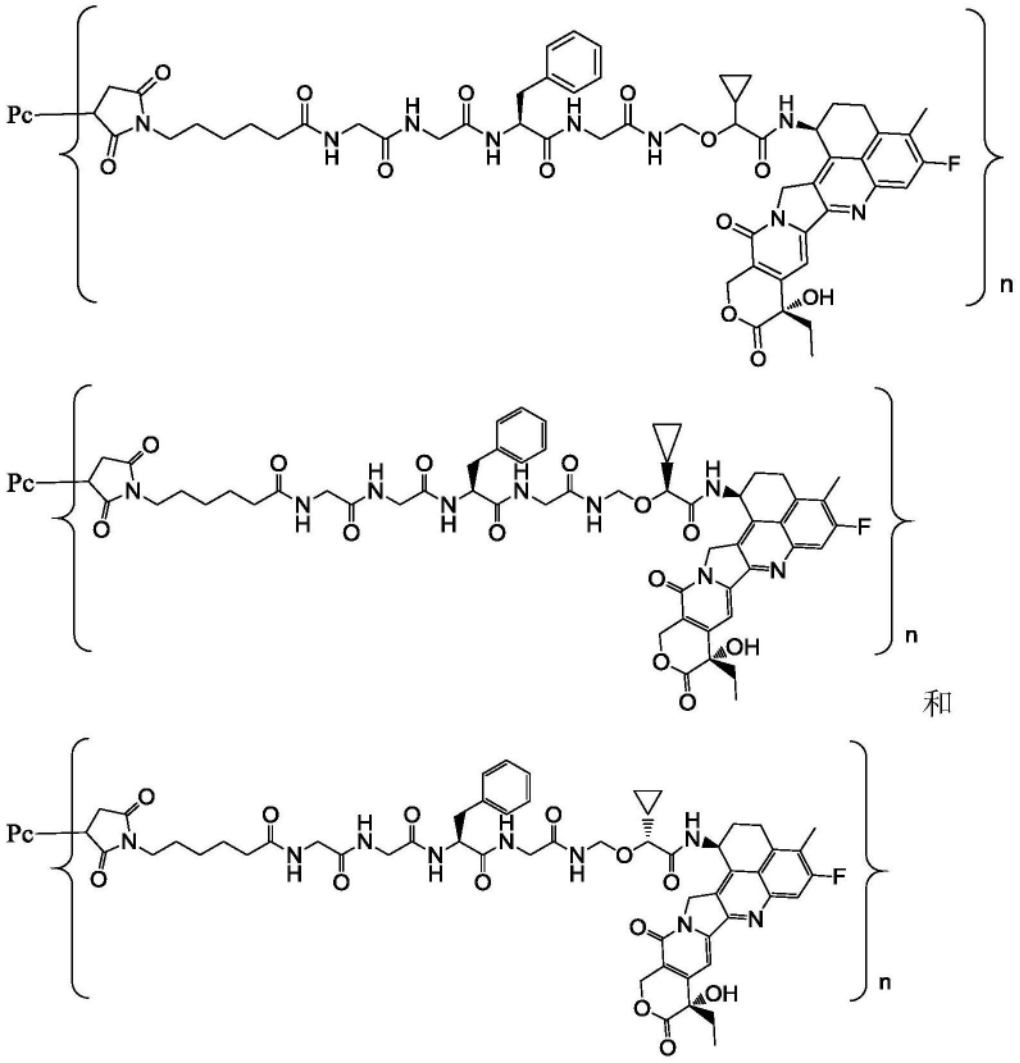
[0100] 
(Pc-L_b-Y-D)

[0101] 其中:

[0102] s^1为2至8的整数;

[0103] Pc、R^1、R^2、R^5~R^7、m和n如通式(Pc-L_a-Y-D)所中所定义。

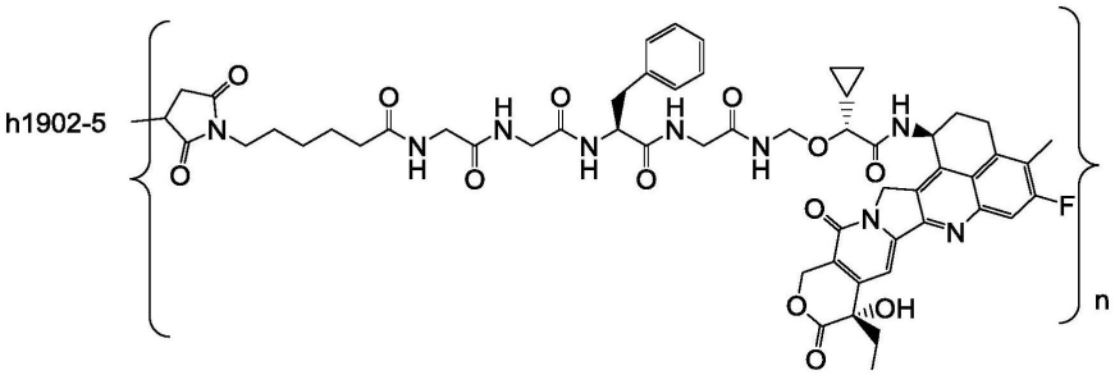
[0104] 在本披露的一些实施方案中,如前任一项所述的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,所述配体-药物偶联物选自:

[0105] 

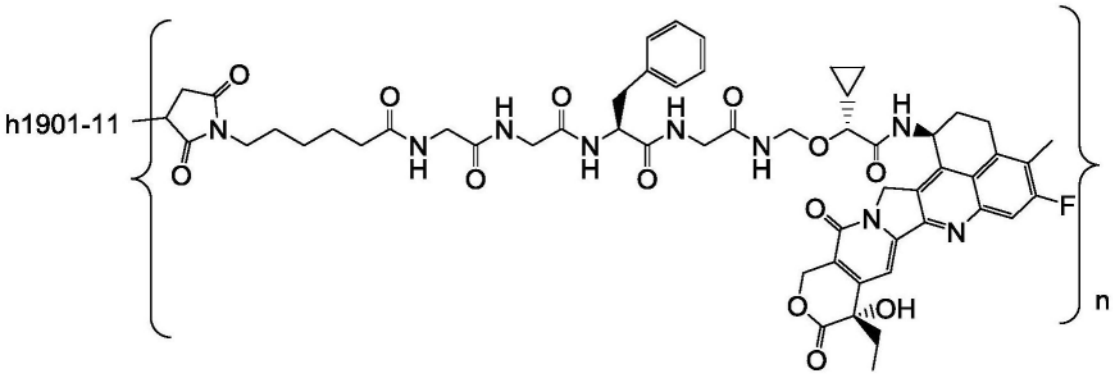
和

[0106] 其中Pc和n如通式(Pc-L-Y-D)中所定义。

[0107] 在本披露的一些实施方案中,提供的通式(Pc-L-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,所述配体-药物偶联物选自:

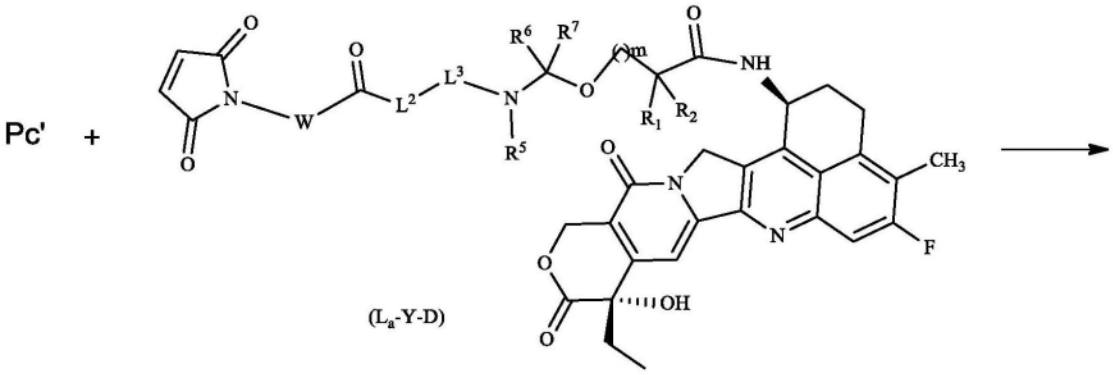
[0108] 

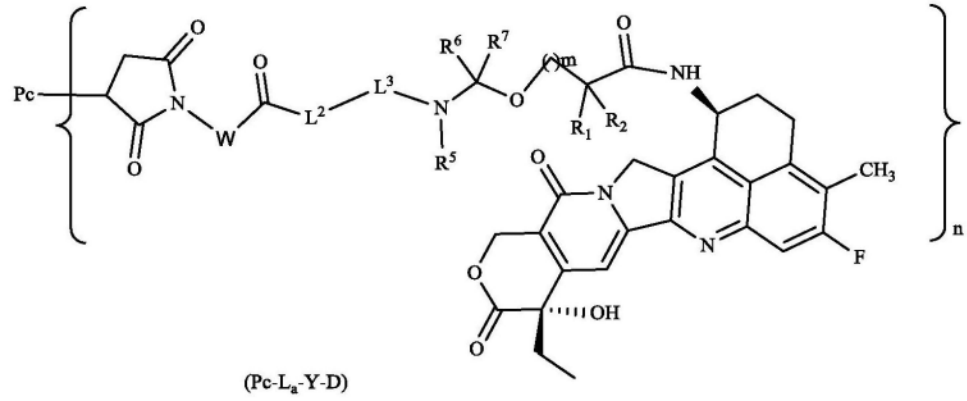
和

[0109] 

[0110] 其中,n如通式(Pc-L-Y-D)中所定义;抗体h1902-5,h1901-11如前所定义。

[0111] 本披露本披露进一步提供一种制备如通式(Pc-L_a-Y-D)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的方法,其包括以下步骤:



[0112] 

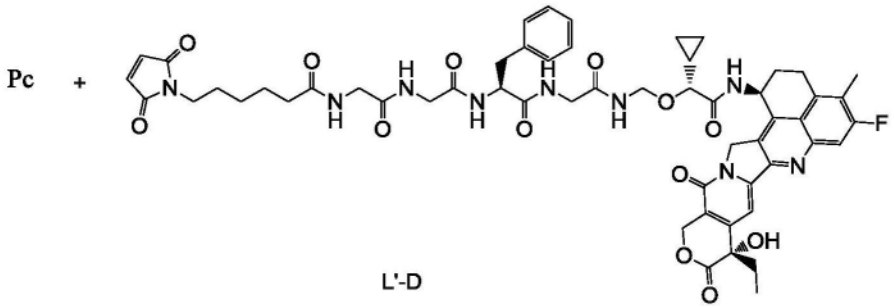
[0113] Pc'与通式(L_a-Y-D)所示的化合物进行偶联反应,得到通式(Pc-L_a-Y-D)所示的化合物;

[0114] 其中:

[0115] Pc为如上所述的抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段;Pc'为Pc经还原后所得;

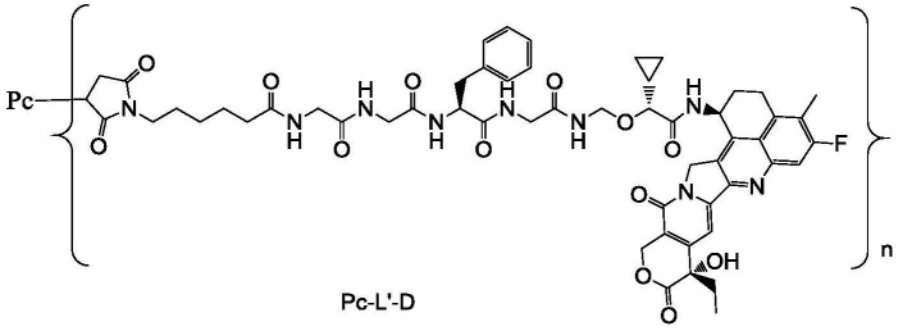
[0116] W、L^2、L^3、R^1、R^2、R^5~R^7、m和n如通式(Pc-L_a-Y-D)中所定义。

[0117] 本披露进一步提供一种制备如通式(Pc-L'-D)所示的抗体药物偶联物的方法,其包括以下步骤:



L'-D

[0118]



Pc-L'-D

[0119] Pc还原后,与通式(L'-D)偶联反应,得到化合物;其中:

[0120] Pc为如前所述的抗Claudin18.2抗体或其抗原结合片段;

[0121] n如通式(Pc-L-Y-D)中所定义。

[0122] 另一方面,本披露提供一种药物组合物,其包含如前任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,以及一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

[0123] 另一方面,本披露提供如前任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物作为药物的用途。在一些实施方案中,其中所述药物用于治疗Claudin18.2介导的疾病或病症;其中所述Claudin18.2介导的疾病或病症优选Claudin18.2高表达癌症。在一些实施方案中,其中所述药物用于治疗癌症。在一些实施方案中,其中所述癌症优选头和颈鳞状细胞癌、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;更优选的,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。

[0124] 另一方面,本披露提供如前任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物在制备用于治疗Claudin18.2介导的疾病或病症的药物中的用途。其中所述Claudin18.2介导的疾病或病症为Claudin18.2高表达癌症。在一些实施方案中,其中所述疾病优选头和颈鳞状细胞癌、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;更优选的,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。

[0125] 另一方面,本披露提供如前任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的用途;其中所述肿瘤和癌症优选头和颈鳞状细胞癌、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;更优选的,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。

[0126] 另一方面,本披露进一步涉及一种用于治疗和/或预防肿瘤的方法,该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效剂量或预防有效剂量的如前任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物;优选其中所述的肿瘤为与Claudin18.2高表达相关的癌症。

[0127] 另一方面,本披露进一步涉及一种用于治疗或预防癌症的方法,该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效剂量或预防有效剂量的如前任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物;其中所述肿瘤和癌症优选头和颈鳞状细胞癌、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;更优选的,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。

[0128] 可将活性化合物(例如根据本披露所述的配体-药物偶联物、或其药学上可接受的盐)制成适合于通过任何适当途径给药的形式,活性化合物优选是以单位剂量的方式,或者是以受试者能够以单剂进行自我给药的方式。本披露的单位剂量的方式可以是片剂、胶囊、扁囊剂、瓶装药水、药粉、颗粒剂、锭剂、栓剂、再生药粉或液体制剂。

[0129] 本披露治疗方法中所用活性化合物或组合物的施用剂量通常将随疾病的严重性、受试者的体重和活性化合物的功效而改变。不过,作为一般性指导,合适的单位剂量可以是0.1mg至1000mg。

[0130] 本披露的药物组合物除活性化合物外,可含有一种或多种辅料,所述辅料选自以下成分:填充剂、稀释剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂或赋形剂等。根据给药方法的不同,组合物可含有0.1至99重量%的活性化合物。

[0131] 本披露提供的Claudin18.2抗体及抗体药物偶联物具有与细胞表面抗原良好的亲和力,良好的细胞内吞效率和很强的肿瘤抑制效率,并且具有更宽的药物应用窗口,适于临床的药物应用。

附图说明

[0132] 图1:人源化抗体在细胞水平与人Claudin18.2结合的FACS检测结果。

[0133] 图2:人源化抗体的NUGC4细胞内吞实验。

[0134] 图3A至图3C:抗体在不同Claudin18.2表达程度的NUGC4细胞中的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。

[0135] 图4:本披露ADC-1的抑瘤实验结果。

[0136] 图5:本披露ADC-2的抑瘤实验结果。

具体实施方式

[0137] 一、术语

[0138] 除非另有限定,本文所用的所有技术和科学术语均与本披露所属领域普通技术人员的通常理解一致。虽然也可采用与本文所述相似或等同的任何方法和材料实施或测试本披露,但本文描述了优选的方法和材料。描述和要求保护本披露时,依据以下定义使用下列术语。

[0139] 当本披露中使用商品名时,旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的非专利药和活性药物部分。

[0140] 除非有相反陈述,在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

[0141] 术语“药物”是指可以改变或查明机体的生理功能及病理状态,可用以预防,诊断和治疗疾病的化学物质。药物包括细胞毒性药物。药物和毒物之间并无严格界限,毒物是指

在较小剂量即对机体产生毒害作用,损害人体健康的化学物质,任何药物剂量过大都可产生毒性反应。细胞毒性药物,即抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性药物原则上在足够的浓度下可以杀死肿瘤细胞,但是由于缺乏特异性,在杀伤肿瘤细胞的同时,也会导致正常细胞的凋亡,导致严重的副作用。细胞毒性药物包括毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,放射性同位素(例如At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}和Lu的放射性同位素),毒素药物,化疗药物,抗生素和核溶酶。

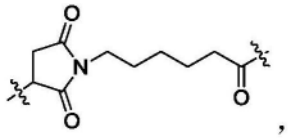
[0142] 术语“接头单元”、“接头”或连接片段”是指一端与配体(如抗体或其抗原结合片段)连接而另一端与药物相连的化学结构片段或键,也可以连接其他接头后再与药物相连。

[0143] 接头可以包含一种或多种接头构件。示例性的接头构件包括6-马来酰亚氨基己酰基(“MC”)、马来酰亚氨基丙酰基(“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”或“vc”)、丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”)、对氨基苄氧羰基(“PAB”)、N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(“SPP”)、N-琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1羧酸酯(“SMCC”,在本文中也称作“MCC”)和N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(“SIAB”)。接头可以包括延伸物、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(例如腙)、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)。

[0144] 缩写

[0145] 接头组件包括但不限于:

[0146] MC=6-马来酰亚氨基己酰基,结构如下:

[0147] ,

[0148] Val-Cit或“vc”=缬氨酸-瓜氨酸(蛋白酶可切割接头中的示例二肽),

[0149] 瓜氨酸=2-氨基-5-脲基戊酸,

[0150] PAB=对氨基苄氧羰基(“自我牺牲”接头组件的示例),

[0151] Me-Val-Cit=N-甲基-缬氨酸-瓜氨酸(其中接头肽键已经修饰以防止其受到组织蛋白酶B的切割),

[0152] MC(PEG)6-OH=马来酰亚氨基己酰基-聚乙二醇(可附着于抗体半胱氨酸),

[0153] SPP=N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯,

[0154] SPDP=N-琥珀酰亚氨基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯,

[0155] SMCC=琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯,

[0156] IT=亚氨基硫烷。

[0157] 术语“配体-药物偶联物”指配体通过连接单元与具有生物活性的药物相连。在本披露中“配体-药物偶联物”优选为抗体-药物偶联物(antibody drug conjugate,ADC),指将单克隆抗体或者抗体片段通过连接单元与具有生物活性的毒性药物相连。抗体可直接地或经接头地偶联至药物。每个抗体的平均药物模块数(平均药物载荷或载药量,可用n值表示),其范围可以是例如每个抗体偶联约0到约20个药物模块,在某些实施方案中是每个抗

体偶联1个到约10个药物模块,在某些实施方案中是每个抗体偶联1个到约8个药物模块。

[0158] 术语“平均药物载荷”或“载药量”是指配体-药物偶联物分子中每个配体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配体(Pc)连接0-12个,优选1-10个细胞毒性药物。在本公开的实施方案中,载药量表示为n,也可称为DAR(Drug-antibody Ratio)值,n可以为0至12的非零整数或小数,优选为1-10之间的整数或小数;更优选为2至8,可以为整数,也可以为小数;最优选为3至8,可以为整数,也可以为小数。示例性的为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10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分子的药物品均数量。

[0159] 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)中所述。

[0160] 密蛋白18(CLD18)分子(Genbank登记号:剪接变体1(CLD18A1):NP_057453、NM016369,以及剪接变体2(CLD18A2或Claudin18.2):NM_001002026、NP_001002026)是内在跨膜蛋白,位于上皮和内皮的紧密连接中。在紧密连接中,闭合蛋白(occludin)和密蛋白是最主要的跨膜蛋白组分。由于密蛋白强胞间粘附特性,它们产生了防止和控制溶质的细胞旁转运并限制膜脂和蛋白质侧向扩散以维持细胞极性的一级屏障。形成紧密连接的蛋白质参与了上皮的组织结构。据报道,这些蛋白质在构造良好的上皮中几乎无法接近抗体,但在肿瘤细胞中则变得暴露出来。

[0161] 术语“抗体”指免疫球蛋白,是由两条重链和两条轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。根据免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同,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。

[0162] 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(Fv区);靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定,为恒定区。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的骨架区(FR)。3个高变区决定抗体的特异性,又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由3个CDR区4个FR区组成,从氨基端到羧基端依次排列的顺序为: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。

[0163] 术语“完全人源抗体”、“完全人抗体”或“全人抗体”,也称“全人源单克隆抗体”,其抗体的可变区和恒定区都是人源的。单克隆抗体的发展经历了四个阶段,分别为:鼠源性单克隆抗体、嵌合性单克隆抗体、人源化单克隆抗体和全人源单克隆抗体。全人源抗体制备的相关技术主要有:人杂交瘤技术、EBV转化B淋巴细胞技术、噬菌体显示技术(phage display)、转基因小鼠抗体制备技术(transgenic mouse)和单个B细胞抗体制备技术等。

[0164] 术语“抗原结合片段”是指抗体的保持结合抗原的能力的一个或多个片段。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。“抗原结合片段”中包含的结合片段选自Fab、Fab’、F(ab’)2、单链抗体(scFv)、二聚化的V区(双抗体)、二硫键稳定化的V区(dsFv)和包含CDR的肽的抗原结合片段,示例包括(i)Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)$F(ab')_2$片段,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)单结构域或dAb片段(Ward等人,(1989)Nature341:544-546),其由VH结构域组成;和(vi)分离的互补决定区(CDR)或(vii)可任选地通过合成的接头连接的两个或更多个分离的CDR的组合。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,通过合成的接头连接它们,从而使得其能够产生为其中VL和VH区配对形成单价分子的单个蛋白质链(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)。此类单链抗体也意欲包括在术语抗体的"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。抗体可以是不同同种型的抗体,例如,IgG(例如,IgG1,IgG2,IgG3或IgG4亚型),IgA1,IgA2,IgD,IgE或IgM抗体。

[0165] 通常,Fab是通过用蛋白酶木瓜蛋白酶(例如,切割H链的224位的氨基酸残基)处理IgG抗体分子所获得的片段中的具有约50,000的分子量并具有抗原结合活性的抗体片段,其中H链N端侧的部分和L链通过二硫键结合在一起。

[0166] 通常,F(ab')2是通过用酶胃蛋白酶消化IgG铰链区中二硫键的下方部分而获得的,其分子量约为100,000,并具有抗原结合活性,并包含在铰链位置相连的两个Fab区的抗体片段。

[0167] 通常,Fab'是通过切割上述F(ab')2的铰链区的二硫键而获得的分子量为约50,000并具有抗原结合活性的抗体片段。

[0168] 此外,可以通过将编码Fab'片段的DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达Fab'来生产所述Fab'。

[0169] 术语"单链抗体"、"单链Fv"或"scFv"意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域(或VH)和抗体轻链可变结构域(或VL)的分子。此类scFv分子可具有一般结构:NH_2-VL-接头-VH-COOH或NH_2-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成,例如使用1-4个重复的变体(Holliger等人(1993),Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448)。可用于本披露的其他接头由Alfthan等人(1995),Protein Eng.8:725-731,Choi等人(2001),Eur.J.Immuno l.31:94-106,Hu等人(1996),Cancer Res.56:3055-3061,Kipriyanov等人(1999),J.Mol.Biol.293:41-56和Roovers等人(2001),Cancer Immunol.描述。

[0170] 术语"CDR"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。所述6个CDR的最常用的定义之一由Kabat E.A.等人,(1991)Sequences of proteins of immunological interest.NIH Publication91-3242)提供。如本文中使用的,CDR的Kabat定义只应用于轻链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3,以及重链可变结构域的CDR2和CDR3。还包括"Chothia"编号规则、"ABM"编号规则、"contact"编号规则(参见Martin,ACR.Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J].2001)和ImMunoGenTics(IMGT)编号规则(Lefranc M.P.,Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(2003)等。

[0171] 术语“抗体框架”,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。

[0172] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上被免疫球蛋白或抗体结合的部位。表位通常以独特的空间构象包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续或非连续的氨基酸。参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular B iology,第66卷,G.E.Morris,Ed.(1996)。

[0173] 术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常,抗体以大约小于10^{-7}M,例如大约小于10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M或更小的亲和力(KD)结合。

[0174] 术语“KD”是指抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常,本披露的抗体(或抗原结合片段)以小于大约10^{-7}M,例如小于大约10^{-8}M或10^{-9}M的解离平衡常数(KD)结合Claudin18.2,(或其表位)例如,在本披露中抗体与细胞表面抗原的亲和力采用FACS法测定KD值。

[0175] 术语“核酸分子”是指DNA分子或RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时,核酸是“有效连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

[0176] 氨基酸序列“同一性”指,比对氨基酸序列过程中,在必要时引入间隙,以达成最大序列同一性百分比,且不将任何保守性取代视为序列同一性的一部分,第一序列中与第二序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为测定氨基酸序列同一性百分比的目的,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。

[0177] 术语“表达载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中,载体是“质粒”,其是指可将另外的DNA区段连接至其中的环状双链DNA环。在另一个实施方案中,载体是病毒载体,其中可将另外的DNA区段连接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组,从而随宿主基因组一起复制(例如,非附加型哺乳动物载体)。

[0178] 现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法,如冷泉港的抗体实验技术指南,5-8章和15章。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的CDR区加上一个或多个人源FR区。人FR种系序列可以通过比对IMGT人类抗体可变区种系基因数据库和MOE软件,从ImMunoGeneTics(IMGT)的网站http://imgt.cines.fr得到,或者从免疫球蛋白杂志,Lefranc,G.,The Immunoglobulin FactsBook,Academic Press,2001ISBN012441351上获得。

[0179] 术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科(enterobacteriaceae)的成员,例如大肠杆菌(Escherichia coli)或沙门氏菌(Salmonella)的菌株;芽孢杆菌科

(Bacillaceae)例如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis);肺炎球菌(Pneumococcus);链球菌(Streptococcus)和流感嗜血菌(Haemophilus influenzae)。适当的微生物包括酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和毕赤酵母(Pichia pastoris)。适当的动物宿主细胞系包括CHO(中国仓鼠卵巢细胞系)和NSO细胞。

[0180] 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,可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染宿主细胞。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N端位点。阳性的克隆在生物反应器的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℃,或者冻干。

[0181] 术语“肽”是指介于氨基酸和蛋白质之间的化合物片段,由2个或2个以上氨基酸分子通过肽键相互连接而成,是蛋白质的结构与功能片段。

[0182] 术语“糖”是指由C、H、O三种元素组成的生物大分子,可分为单糖、二糖和多糖等。

[0183] 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(包含1个、2个、3个、4个、5个或6个碳原子)的烷基。非限制性示例包括甲基、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、杂环烷硫基和氧代基。

[0184] 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。

[0185] 术语“亚烷基”指饱和的直链或支链脂肪族烃基,其具有2个从母体烷的相同碳原

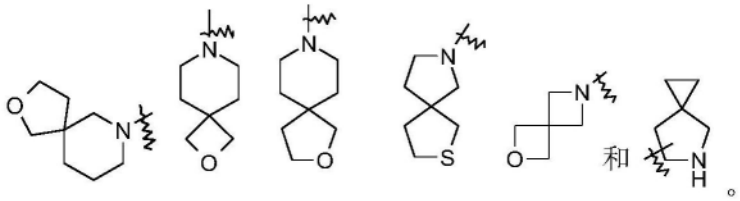
子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基，其为包含1至20个碳原子的直链或支链基团，优选含有1至12个碳原子，更优选含有1至6个碳原子（包含1个、2个、3个、4个、5个或6个碳原子）的亚烷基。亚烷基的非限制性实例包括但不限于亚甲基（-CH_2-）、1,1-亚乙基（-CH(CH_3)-）、1,2-亚乙基（-CH_2CH_2）-、1,1-亚丙基（-CH(CH_2CH_3)-）、1,2-亚丙基（-CH_2CH(CH_3)-）、1,3-亚丙基（-$CH_2CH_2CH_2$-）、1,4-亚丁基（-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-）和1,5-亚丁基（-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-）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。

[0186] 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。烷氧基的非限制性示例包括：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、环烷硫基和杂环烷硫基。

[0187] 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8个碳原子（包含3个、4个、5个、6个、7个或8个碳原子）。单环环烷基的非限制性示例包括环丙基、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、环庚三烯基和环辛基等；多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。

[0188] 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、1或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。优选包含3至12个环原子，其中1至4个是杂原子（1个、2个、3个或4个杂原子）；更优选环烷基环包含3至10个环原子（包含3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个环原子）。单环杂环基的非限制性示例包括吡咯烷基、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。

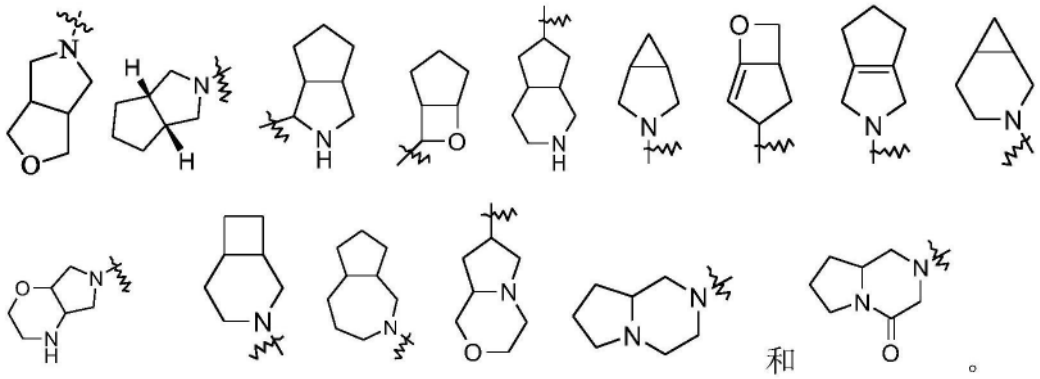
[0189] 术语“螺杂环基”指5至20元的单环之间共用一个原子（称螺原子）的多环杂环基团，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或S(O)$_m$（其中m是整数0至2）的杂原子，其余环原子为碳。其可以含有一个或多个双键，但没有一个环具有完全共轭的π电子系统。优选为6至14元，更优选为7至10元。根据环与环之间共用螺原子的数目将螺杂环基分为单螺杂环基、双螺杂环基或多螺杂环基，优选为单螺杂环基和双螺杂环基。更优选为4元/4元、4元/5元、4元/6元、5元/5元或5元/6元单螺杂环基。螺杂环基的非限制性示例包括：

[0190] 

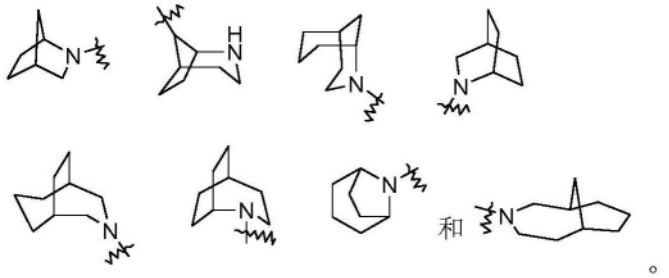
。

[0191] 术语“稠杂环基”指5至20元，系统中的每个环与体系中的其他环共享毗邻的一对原子的多环杂环基团，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

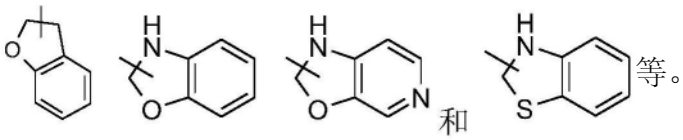
轭的π电子系统,其中一个或多个环原子为选自氮、氧或S(O)$_m$(其中m是整数0、1或2)的杂原子,其余环原子为碳。优选为6至14元,更优选为7至10元(7元、8元、9元或10元环)。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环稠杂环基,优选为双环或三环,更优选为5元/5元或5元/6元双环稠杂环基。稠杂环基的非限制性示例包括:

[0192] 

[0193] 术语“桥杂环基”指5至14元,任意两个环共用两个不直接连接的原子的多环杂环基团,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,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、1或2)的杂原子,其余环原子为碳。优选为6至14元,更优选为7至10元(7元、8元、9元或10元环)。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环桥杂环基,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示例包括:

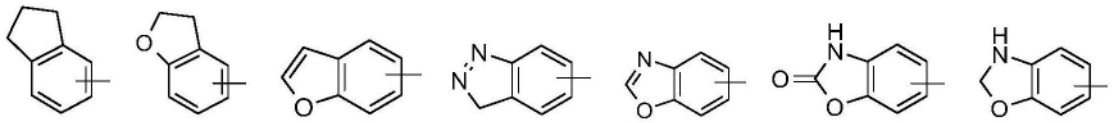
[0194] 

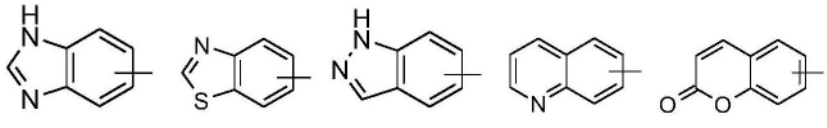
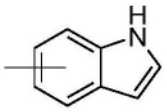
[0195] 所述杂环基环可以稠合于芳基、杂芳基或环烷基环上,其中与母体结构连接在一起的环为杂环基,其非限制性示例包括:

[0196] 

[0197] 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、杂环烷硫基和氧代基。

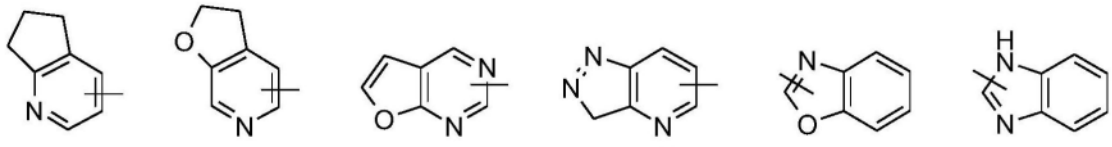
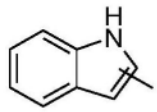
[0198] 术语“芳基”指具有共轭的π电子体系的6至14元全碳单环或稠合多环(也就是共享毗邻碳原子对的环)基团,优选为6至10元(6元、7元、8元、9元或10元),例如苯基和萘基,优选苯基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环基或环烷基环上,其中与母体结构连接在一起的环为芳基环,其非限制性示例包括:

[0199] 

[0200]  和  。

[0201] 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、环烷硫基和杂环烷硫基。

[0202] 术语“杂芳基”指包含1至4个杂原子(1个、2个、3个或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(5元、6元、7元、8元、9元或10元杂芳基),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、咪唑基和四唑基等。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,其非限制性示例包括:

[0203]  和  。

[0204] 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、环烷硫基和杂环烷硫基。

[0205] 术语“氨基保护基”是为了使分子其它部位进行反应时氨基保持不变,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(1个、2个或3个取代基)所取代。所述氨基保护基优选为9-芴甲氧羰基。

[0206] 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。

[0207] 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。

[0208] 术语“羟烷基”指烷基上的氢被一个或多个羟基取代,其中烷基如上所定义。

[0209] 术语“羟基”指-OH基团。

[0210] 术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

[0211] 术语“氨基”指-NH_2。

[0212] 术语“硝基”指-NO_2。

[0213] 术语“氰基”指-CN。

[0214] 术语“酰氨基”指-C(O)N(烷基)或(环烷基),其中烷基、环烷基如上所定义。

[0215] “任选”或“任选地”意味着随后所描述的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地场合。例如,“任选被烷基取代的杂环基团”意味着烷基可以但不必须存在,该说明包括杂环基团被烷基取代的情形和杂环基团不被烷基取代的情形。

[0216] “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个、2个或3个氢原子彼此独立地被取代基取代。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。

[0217] 术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物,以及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。

[0218] 术语“药学上可接受的盐”或“可药用盐”是指本披露配体-药物偶联物的盐,或本披露中所述的活性化合物的盐,这类盐用于受试者时具有安全性和有效性,且具有应有的生物活性,本披露配体-药物偶联物至少含有一个氨基,因此可以与酸形成盐,可药用盐的非限制性示例包括:盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐。

[0219] 本披露的一个实施方式中,细胞毒性药物通过连接单元偶联在抗体的巯基上。

[0220] 可以用以下非限制性方法控制配体细胞毒性药物偶联物的载量,包括:

[0221] (1)控制连接试剂和单抗的摩尔比,

[0222] (2)控制反应时间和温度,

[0223] (3)选择不同的反应试剂。

[0224] 常规的药物组合物的制备见中国药典。

[0225] 术语“药学上可接受的载体”用于本披露的药物,是指能改变药物进入受试者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,优选的示例如胶束、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。

[0226] 术语“赋形剂”是在药物组合物中除活性化合物以外的附加物,也可称为辅料。如片剂中的粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂;半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分;液体制剂中的防腐剂、抗氧剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂、着色剂等均可称为赋形剂。

[0227] 术语“稀释剂”又称填充剂,其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小,而且减少主要成分的剂量偏差,改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时,需加入吸收剂吸收油性物,使保持“干燥”状态,以利于制成片剂。如淀粉、乳糖、钙的无机盐、微晶纤维素等。

[0228] 药物组合物可以是无菌注射水溶液形式。可在使用的可接受的溶媒和溶剂中有水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。无菌注射制剂可以是其中活性成分溶于油相的无菌注射水包油微乳。例如将活性成分溶于大豆油和卵磷脂的混合物中。然后将油溶液加入水和甘油的混合物中处理形成微乳。可通过局部大量注射,将注射液或微乳注入受试者的血流中。或者,最好按可保持本披露化合物恒定循环浓度的方式给予溶液和微乳。为保持这种恒定

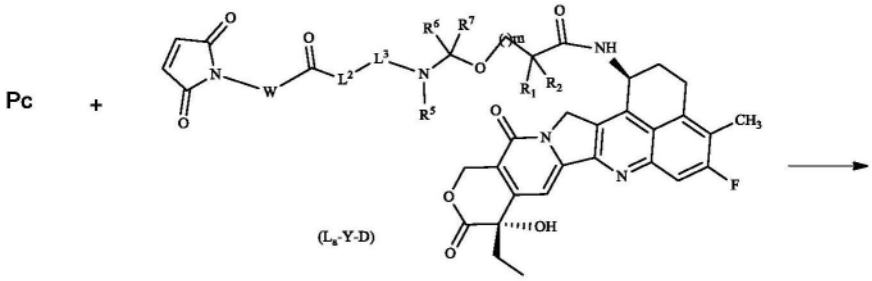
浓度,可使用连续静脉内递药装置。这种装置的示例是Deltec CADD-PLUS.TM.5400型静脉注射泵。

[0229] 药物组合物可以是用于肌内和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可按已知技术,用上述那些适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混悬液,例如1,3-丁二醇中制备的溶液。此外,可方便地用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。为此目的,可使用包括合成甘油单或二酯在内的任何调和固定油。此外,脂肪酸例如油酸也可以制备注射剂。

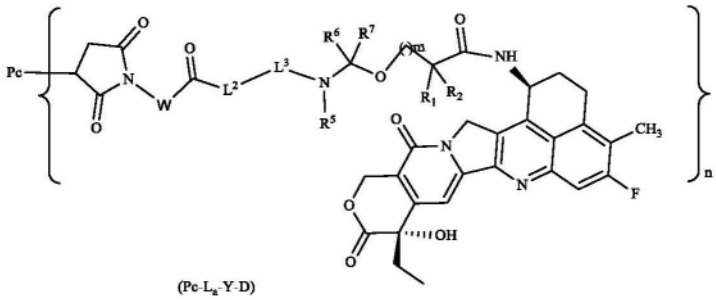
[0230] 二、合成方法

[0231] 为了完成合成目的,采用如下的合成技术方案:

[0232] 通式(Pc-L_a-Y-D)所示的化合物的制备方法,其包括如下步骤:



[0233]



[0234] Pc还原后,与通式(L_a-Y-D)偶联反应,得到通式(Pc-L_a-Y-D)所示的化合物;还原剂优选TCEP,特别地,优选还原抗体上的二硫键;

[0235] 其中:Pc、W、L^2、L^3、R^1、R^2、R^5~R^7、m和n如通式(Pc-L_a-Y-D)中所定义。

[0236] 在以上说明书中提出了本披露一种或多种实施方案的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本披露,但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书,本披露的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中,除非上下文中有清楚的另外指明,单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语都具有本披露所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本披露的优选实施方案。这些实施例不应以任何方式理解为限制本披露的范围,本披露的范围由权利要求书限定。

[0237] 实施例

[0238] 一、抗体的制备

[0239] 实施例1-1:claudin18.2高表达细胞株构建

[0240] 将pCDH-hClaudin18.2慢病毒表达载体质粒与pVSV-G,pCMV-dR8.91慢病毒系统包装载体用Lipofectamine 3000转染试剂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。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表平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。

[0241] 将挑选出的单克隆细胞株扩大培养,冻存备库以便后续实验。

[0242] Claudin18.2序列Genbank:NP_001002026:(SEQ ID NO:1)

[0243] MAVTACQGLGFVVSLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV;

[0244] Claudin18.2 DNA序列:(SEQ ID NO:2)

[0245] 1 AGAATTGCGC TGTCCACTTG TCGTGTGGCT CTGTGTCGAC

[0246] ACTGTGCGCC ACCATGGCCG

[0247] 61 TGACTGCCTG TCAGGGCTTG GGGTTCGTGG TTTCACTGAT

[0248] TGGGATTGCG GGCATCATTG

[0249] 121 CTGCCACCTG CATGGACCAG TGGAGCACCC AAGACTTGTA

[0250] CAACAACCCC GTAACAGCTG

[0251] 181 TTTTCAACTA CCAGGGGCTG TGGCGCTCCT GTGTCCGAGA

[0252] GAGCTCTGGC TTCACCGAGT

[0253] 241 GCCGGGGCTA CTTCACCCTG CTGGGGCTGC CAGCCATGCT

[0254] GCAGGCAGTG CGAGCCCTGA

[0255] 301 TGATCGTAGG CATCGTCCTG GGTGCCATTG GCCTCCTGGT

[0256] ATCCATCTTT GCCCTGAAAT

[0257] 361 GCATCCGCAT TGGCAGCATG GAGGACTCTG CCAAAGCCAA

[0258] CATGACACTG ACCTCCGGGA

[0259] 421 TCATGTTCAT TGTCTCAGGT CTTTGTGCAA TTGCTGGAGT

[0260] GTCTGTGTTT GCCAACATGC

[0261] 481 TGGTGACTAA CTTCTGGATG TCCACAGCTA ACATGTACAC

[0262] CGGCATGGGT GGGATGGTGC

[0263] 541 AGACTGTTCA GACCAGGTAC ACATTTGGTG CGGCTCTGTT

[0264] CGTGGGCTGG GTCGCTGGAG

[0265] 601 GCCTCACACT AATTGGGGGT GTGATGATGT GCATCGCCTG

[0266] CCGGGGCCTG GCACCAGAAG

[0267] 661 AAACCAACTA CAAAGCCGTT TCTTATCATG CCTCAGGCCA

[0268] CAGTGTTGCC TACAAGCCTG

[0269] 721 GAGGCTTCAA GGCCAGCACT GGCTTTGGGT CCAACACCAA

[0270] AAACAAGAAG ATATACGATG

[0271] 781 GAGGTGCCCG CACAGAGGAC GAGGTACAAT CTTATCCTTC

[0272] CAAGCACGAC TATGTGTAAT

[0273] 841 GCTCTAAGAC CTCTCAGCAC GGGCGGAAGA AACTCCCGGA

[0274] GAGCTCACCC AAAAAACAAG

[0275] 901 GAGATCCCAT CTAGATTTCT TCTTGCTTTT GACTCACAGC

[0276] TGGAAGTTAG AAAAGCCTCG

[0277] 961 ATTTCATCTT TGGAGAGGCC AAATGGTCTT AGCCTCAGTC

[0278] TCTGTCTCTA AATATTCCAC

[0279] 1021 CATAAAACAG CTGAGTTATT TATGAATTAG AGGCTATAGC

[0280] TCACATTTTC AATCCTCTAT

[0281] 1081 TTCTTTTTTT AAATATAACT TTCTACTCTG ATGAGAGAAT

[0282] GTGGTTTTAA TCTCTCTCTC

[0283] 1141 ACATTTTGAT GATTTAGACA GACTCCCCCT CTTCCTCCTA

[0284] GTCAATAAAC CCATTGATGA

[0285] 1201 TCTATTTCCC AGCTTATCCC CAAGAAAACT TTTGAAAGGA

[0286] AAGAGTAGAC CCAAAGATGT

[0287] 1261 TATTTTCTGC TGTTTGAATT TTGTCTCCCC ACCCCCAACT

[0288] TGGCTAGTAA TAAACACTTA

[0289] 1321 CTGAAGAAGA AGCAATAAGA GAAAGATATT TGTAATCTCT

[0290] CCAGCCCATG ATCTCGGTTT

[0291] 1381 TCTTACACTG TGATCTTAAA AGTTACCAAA CCAAAGTCAT

[0292] TTTCAGTTTG AGGCAACCAA

[0293] 1441 ACCTTTCTAC TGCTGTTGAC ATCTTCTTAT TACAGCAACA

[0294] CCATTCTAGG AGTTTCCTGA

[0295] 1501 GCTCTCCACT GGAGTCCTCT TTCTGTCGCG GGTCAGAAAT

[0296] TGTCCCTAGA TGAATGAGAA

[0297] 1561 AATTATTTTT TTTAATTTAA GTCCTAAATA TAGTTAAAAT

[0298] AAATAATGTT TTAGTAAAAT

[0299] 1621 GATACACTAT CTCTGTGAAA TAGCCTCACC CCTACATGTG

[0300] GATAGAAGGA AATGAAAAAA

[0301] 1681 TAATTGCTTT GACATTGTCT ATATGGTACT TTGTAAAGTC

[0302] ATGCTTAAGT ACAAATTCCA

[0303] 1741 TGAAAAGCTC ACTGATCCTA ATTCTTTCCC TTTGAGGTCT

[0304] CTATGGCTCT GATTGTACAT

[0305] 1801 GATAGTAAGT GTAAGCCATG TAAAAAGTAA ATAATGTCTG

[0306] GGCACAGTGG CTCACGCCTG

[0307] 1861 TAATCCTAGC ACTTTGGGAG GCTGAGGAGG AAGGATCACT

[0308] TGAGCCCAGA AGTTCGAGAC

[0309] 1921 TAGCCTGGGC AACATGGAGA AGCCCTGTCT CTACAAAATA

[0310] CAGAGAGAAA AAATCAGCCA

[0311] 1981 GTCATGGTGG CCTACACCTG TAGTCCCAGC ATTCCGGGAG

[0312] GCTGAGGTGG GAGGATCACT

[0313] 2041 TGAGCCCAGG GAGGTTGGGG CTGCAGTGAG CCATGATCAC

[0314] ACCACTGCAC TCCAGCCAGG

[0315] 2101 TGACATAGCG AGATCCTGTC TAAAAAAATA AAAAATAAAT

[0316] AATGGAACAC AGCAAGTCCT

[0317] 2161 AGGAAGTAGG TTAAAACTAA TTCTTTAAAA AAAAAAAAAA

[0318] GTTGAGCCTG AATTAAATGT

[0319] 2221 AATGTTTCCA AGTGACAGGT ATCCACATTT GCATGGTTAC

[0320] AAGCCACTGC CAGTTAGCAG

[0321] 2281 TAGCACTTTC CTGGCACTGT GGTCGGTTTT GTTTTGTTTT

[0322] GCTTTGTTTA GAGACGGGGT

[0323] 2341 CTCACTTTCC AGGCTGGCCT CAAACTCCTG CACTCAAGCA

[0324] ATTCTTCTAC CCTGGCCTCC

[0325] 2401 CAAGTAGCTG GAATTACAGG TGTGCGCCAT CACAACTAGC

[0326] TGGTGGTCAG TTTTGTTACT

[0327] 2461 CTGAGAGCTG TTCACTTCTC TGAATTCACC TAGAGTGGTT

[0328] GGACCATCAG ATGTTTGGGC

[0329] 2521AAAACTGAAA GCTCTTTGCA ACCACACACC TTCCCTGAGC TTACATCACT GCCCTTTTGA

[0330] 2581GCAGAAAGTC TAAATTCCTT CCAAGACAGT AGAATTCCAT CCCAGTACCA AAGCCAGATA

[0331] 2641GGCCCCCTAG GAAACTGAGG TAAGAGCAGT CTCTAAAAAC TACCCACAGC AGCATTGGTG

[0332] 2701CAGGGGAACT TGGCCATTAG GTTATTATTT GAGAGGAAAG TCCTCACATC AATAGTACAT

[0333] 2761ATGAAAGTGA CCTCCAAGGG GATTGGTGAA TACTCATAAG GATCTTCAGG CTGAACAGAC

[0334] 2821TATGTCTGGG GAAAGAACGG ATTATGCCCC ATTAAATAAC AAGTTGTGTT CAAGAGTCAG

[0335] 2881AGCAGTGAGC TCAGAGGCCC TTCTCACTGA GACAGCAACA TTTAAACCAA ACCAGAGGAA

[0336] 2941GTATTTGTGG AACTCACTGC CTCAGTTTGG GTAAAGGATG AGCAGACAAG TCAACTAAAG

[0337] 3001AAAAAAGAAA AGCAAGGAGG AGGGTTGAGC AATCTAGAGC ATGGAGTTTG TTAAGTGCTC

[0338] 3061TCTGGATTTG AGTTGAAGAG CATCCATTTG AGTTGAAGGC CACAGGGCAC AATGAGCTCT

[0339] 3121CCCTTCTACC ACCAGAAAGT CCCTGGTCAG GTCTCAGGTA GTGCGGTGTG GCTCAGCTGG

[0340] 3181GTTTTTAATT AGCGCATTCT CTATCCAACA TTTAATTGTT TGAAAGCCTC CATATAGTTA

[0341] 3241GATTGTGCTT TGTAATTTTG TTGTTGTTGC TCTATCTTAT TGTATATGCA TTGAGTATTA

[0342] 3301ACCTGAATGT TTTGTTACTT AAATATTAAA AACACTGTTA TCCTACAGTT。

[0343] 实施例1-2:抗人claudin18.2单克隆抗体产生

[0344] 1免疫

[0345] 抗人Claudin18.2单克隆抗体通过免疫小鼠产生。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,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,12/12小时光/暗周期调节,温度20-25℃;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)。

[0346] 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。

[0347] 2脾细胞融合

[0348] 采用优化的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。融合所得的杂交瘤细胞以0.5-1×10^6/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℃,5%CO_2孵育3-4天后,补充HAT完全培养基100μL/孔,继续培养3-4天至形成针尖般克隆。去除上清,加入200μL/孔的HT完全培养基(含20%FBS、1×HT和1×OPI的IMDM培养基),37℃,5%CO_2培养3天后进行ELISA检测。

[0349] 3杂交瘤细胞筛选

[0350] 根据杂交瘤细胞生长密度,用结合ELISA方法检测杂交瘤培养上清。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及时进行扩增冻存,进行二到三次亚克隆直至获得单细胞克隆。

[0351] 每次亚克隆细胞也均需进行细胞结合实验检测。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,按纯化示例纯化抗体,供在检测例中使用。

[0352] 实施例1-3:鼠源抗体的人源化

[0353] 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。

[0354] 从杂交瘤中克隆序列过程如下。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),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扩增后送测序公司测序。得到的杂交瘤细胞DNA序列对应的氨基酸序列SEQ ID NO:3-6所示:

[0355] mAb1901鼠源重链可变区(SEQ ID NO:3)

[0356] EVQLMESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPEMGLEWIAYISRGSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTSVTVSS;

[0357] mAb1901鼠源轻链可变区(SEQ ID NO:4)

[0358] DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYHCQNDLYYPLTFGAGTKLELK;

[0359] mAb1902鼠源重链可变区(SEQ ID NO:5)

[0360] EVQLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSSSTAYMQLSSLPSEDSAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTLTVSS;

[0361] mAb1902鼠源轻链可变区(SEQ ID NO:6)

[0362] DIVLTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQNAYTYPFTFGSGTKLEIK;

[0363] 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。

[0364] 恒定区选自以下序列:

[0365] 人IgG1抗体的重链恒定区:(SEQ ID NO:7)

[0366] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK;

[0367] 人源κ轻链恒定区:(SEQ ID NO:8)

[0368] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

[0369] 鼠源单克隆抗体人源化如本领域许多文献公示的方法进行。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。

[0370] 1、鼠源抗体的CDR区

[0371] 表1中VH/VL CDR的氨基酸残基由Kabat编号系统确定并注释。

[0372] 鼠源抗体的CDR序列如表1所述:

[0373] 表1鼠源抗体的CDR序列

[0374]

抗体	mAb1901
HCDR1	DYGIH (SEQ ID NO: 9)
HCDR2	YISRGSSTIYYADTVKG (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	MIHPNSGSTNYNEKFKG (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)

[0375]

[0376] 2、选择人种系FR区序列

[0377] 在所获得的鼠源抗体VH/VLCDR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。

[0378] 2.1mAb1901的人源化改造和回复突变设计

[0379] 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:

[0380] 表2mAb1901人源化抗体及回复突变*

[0381]

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

[0382] *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。

[0383] 表3mAb1901人源化抗体轻链可变区和重链可变区序列

[0384]

可变区名称 (SEQ ID NO:)	序列
VL1 (SEQ ID NO:21)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIK
VL2 (SEQ ID NO: 22)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIK
VL3 (SEQ ID	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV

[0385]

NO:23)	AIYHCQNDLYYPLTFGQGTKLEIK
VH1 (SEQ ID NO:24)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGK GLEWVAYISRGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSS
VH2 (SEQ ID NO: 25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGK GLEWVAYISRGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMTSLR AEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSS
VH3 (SEQ ID NO:26)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGK GLEWIAYISRGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMTSLR AEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSS
VH4 (SEQ ID NO: 27)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGK GLEWVAYISRGSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNSLYLQMTSL RAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSS

[0386] 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。

[0387] 2.2mAb1902的人源化改造和回复突变设计

[0388] 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:

[0389] 表4mAb1902人源化抗体及其回复突变设计*

[0390]

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

[0391] *表格中所有氨基酸位置编号为Kabat编号规则的编号。

[0392] 表5mAb1902人源化抗体轻链可变区和重链可变区序列

[0393]

可变区名称(SEQ ID NO:)	序列
VL11 (SEQ ID	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLT WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI

NO:28)	SSLQAEDVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIK
VL12 (SEQ ID NO:29)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIK
VL13 (SEQ ID NO: 30)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLTW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIK
VH11 (SEQ ID NO: 31)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVR QAPGQRLEWMGMIHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDTSAS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTV SS
VH12 (SEQ ID NO:32)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVR QAPGQRLEWMGMIHPNSGSTNYNEKFKGRVTLTLDKSAS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTV SS
VH13 (SEQ ID NO: 33)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVR QAPGQRLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVS S
VH14 (SEQ ID NO:34)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVK QRPGQRLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVS S

[0394]

[0395] 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。

[0396] 嵌合抗体ch1901

[0397] ch1901重链:(SEQ ID NO:35)

[0398] EVQLMESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPEMGLEWIAYISR

[0399] GSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARGGYDTRN

[0400] AMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV

[0401] SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV

[0402] DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

[0403] SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE

[0404] YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY

[0405] PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK;

[0406] ch1901轻链(SEQ ID NO:36)

[0407] DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLI

[0408] YGASTRASGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYHCQNDLYYPLTFGAGTK

[0409] LELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG

[0410] NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

[0411] 嵌合抗体ch1902

[0412] ch1902重链(SEQ ID NO:37)

[0413] EVQLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIHP

[0414] NSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSSSTAYMQLSSLPSEDSAVYYCARLKTGNSFDY

[0415] WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

[0416] GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

[0417] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED

[0418] PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

[0419] KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI

[0420] AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK;

[0421] ch1902轻链(SEQ ID NO:38)

[0422] DIVLTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLI

[0423] YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQNAYTYPFTFGSGTK

[0424] LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG

[0425] NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

[0426] 表6展示了mAb1901的人源化抗体:

[0427] 表6 mAb1901人源化抗体

[0428]

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

[0429] 备注:表中人源化抗体h1901-1的重链为H1,轻链为L1,其它以此类推。mAb1901的人源化抗体的全长抗体轻重链序列如下表7所示:

[0430] 表7 mAb1901人源化抗体轻链和重链序列

[0431]

可变区名称 (SEQ ID NO:)	序列
L1 (SEQ ID NO:39)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ

[0432]

	DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
L2 (SEQ ID NO: 40)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
L3 (SEQ ID NO:41)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAIYHCQNDLYYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
H1 (SEQ ID NO:42)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPG KGLEWVAYISRGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H2 (SEQ ID NO: 43)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPG KGLEWVAYISRGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMTS LRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H3 (SEQ ID NO:44)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPG KGLEWIAYISRGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMTSL RAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV

	HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H4 (SEQ ID NO: 45)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPG KGLEWVAYISRGSSTIYYADTVKGRFTMSRDNAKNSLYLQMT SLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0433]

[0434] 表8展示了mAb1902的人源化抗体：

[0435] 表8 mAb1902人源化抗体

[0436]

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

[0437] 备注:表中人源化抗体h1902-1的重链为H11,轻链为L11,其它以此类推。

[0438] mAb1902的人源化抗体轻重链序列如下表9所示：

[0439] 表9 mAb1901人源化抗体轻链和重链序列

[0440]

可变区名称(SEQ ID NO:)	序列
L11 (SEQ ID NO:46)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

[0441]

L12 (SEQ ID NO:47)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
L13 (SEQ ID NO: 48)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA EDVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
H11 (SEQ ID NO:49)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQ APGQRLEWMGMIHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDTSASTAY MELSSLRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H12 (SEQ ID NO:50)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQ APGQRLEWMGMIHPNSGSTNYNEKFKGRVTLTLDKSASTAY MELSSLRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H13 (SEQ ID NO: 51)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQ APGQRLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAY MELSSLRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK

[0442]

	DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H14 (SEQ ID NO:52)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVKQ RPGQRLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAY MELSSLRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0443] 本披露阳性对照抗体为IMAB-362(来自WO2016166122)

[0444] IMAB-362重链(SEQ ID NO:53):1QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWINWVKQR

[0445] PGQGLEWIGN

[0446] 51IYPSDSYTNY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY MQLSSPTSED

[0447] SAVYYCTRSW

[0448] 101RGNSFDYWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT

[0449] AALGCLVKDY

[0450] 151FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP

[0451] SSSLGTQTYI

[0452] 201CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS

[0453] VFLFPPKPKD

[0454] 251TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT

[0455] KPREEQYNST

[0456] 301YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA

[0457] KGQPREPQVY

[0458] 351TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN

[0459] NYKTTPPVLD

[0460] 401SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK;

[0461] IMAB-362轻链(SEQ ID NO:54):1DIVMTQSPSS LTVTAGEKVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT

[0462] WYQQKPGQPP

[0463] 51KLLIYWASTR ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSVQAEDLA

[0464] VYYCQNDYSY

[0465] 101PFTFGSGTKL EIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC

[0466] LLNNFYPREA

[0467] 151KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA

[0468] DYEKHKVYAC

[0469] 201EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC。

[0470] 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。

[0471] 二、化合物的制备

[0472] 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,或按照原料或商品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。

[0473] 化合物的结构是通过核磁共振(NMR)或质谱(MS)来确定的。NMR的测定是用Bruker AVANCE-400核磁仪,测定溶剂为氘代二甲基亚砜(DMSO-d6)、氘代氯仿($CDCl_3$)、氘代甲醇(CD_3OD),内标为四甲基硅烷(TMS),化学位移是以10^{-6}(ppm)作为单位给出。

[0474] MS的测定用FINNIGAN LCQAd(ESI)质谱仪(生产商:Thermo,型号:Finnigan LCQ advantage MAX)。

[0475] UPLC的测定用Waters Acquity UPLC SQD液质联用仪。

[0476] HPLC的测定使用安捷伦1200DAD高压液相色谱仪(Sunfire C18 150×4.6mm色谱柱)和Waters 2695-2996高压液相色谱仪(Gimini C18 150×4.6mm色谱柱)。

[0477] UV-HPLC的测定使用Thermo nanodrop2000紫外分光光度计。

[0478] 增殖抑制率及IC_{50}值的测定用PHERAstarFS酶标仪(德国BMG公司)。

[0479] 薄层层析硅胶板使用烟台黄海HSGF254或青岛GF254硅胶板,薄层色谱法(TLC)使用的硅胶板采用的规格是0.15mm至0.2mm,薄层层析分离纯化产品采用的规格是0.4mm至0.5mm硅胶板。

[0480] 柱层析一般使用烟台黄海200~300目硅胶为载体。

[0481] 本披露的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成,或可购买自ABCR GmbH&Co.KG,Acros Organnics,Aldrich Chemical Company,韶远化学科技(Accela ChemBio Inc)、达瑞化学品等公司。

[0482] 实施例中如无特殊说明,反应均在氩气氛或氮气氛下进行。

[0483] 氩气氛或氮气氛是指反应瓶连接一个约1L容积的氩气或氮气气球。

[0484] 氢气氛是指反应瓶连接一个约1L容积的氢气气球。

[0485] 加压氢化反应使用Parr 3916EKX型氢化仪和清蓝QL-500型氢气发生器或HC2-SS型氢化仪。

[0486] 氢化反应通常抽真空,充入氢气,反复操作3次。

[0487] 微波反应使用CEM Discover-S 908860型微波反应器。

[0488] 实施例中如无特殊说明,反应中的溶液是指水溶液。

[0489] 实施例中如无特殊说明,反应的温度为室温。

[0490] 室温为最适宜的反应温度,温度范围是20℃至30℃。

[0491] 实施例中pH=6.5的PBS缓冲液的配制:取KH_2PO_4 8.5g,$K_2HPO_4.3H_2O$ 8.56g,NaCl 5.85g,EDTA 1.5g置于瓶中,定容至2L,超声波使其全部溶解,摇匀即得。

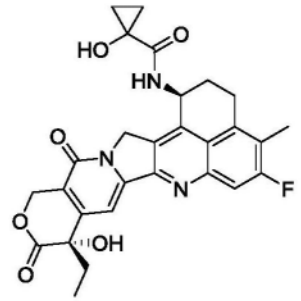
[0492] 纯化化合物采用的柱层析的洗脱剂的体系和薄层色谱法的展开剂的体系包括:A:二氯甲烷和异丙醇体系,B:二氯甲烷和甲醇体系,C:石油醚和乙酸乙酯体系,溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节,也可以加入少量的三乙胺和酸性或碱性试剂等进行调节。

[0493] 本披露部分化合物是通过Q-TOF LC/MS来表征的。Q-TOF LC/MS使用安捷伦6530精确质量数四级杆-飞行时间质谱仪和安捷伦1290-Infinity超高效液相色谱仪(安捷伦Poroshell 300SB-C8 5μm,2.1×75mm色谱柱)。

[0494] 本披露抗体药物偶联物的Y-D药物部分参见PCT/CN2019/107873,相关的化合物合成及测试引用至本专利。其中的非限制性实施例合成引用如下:

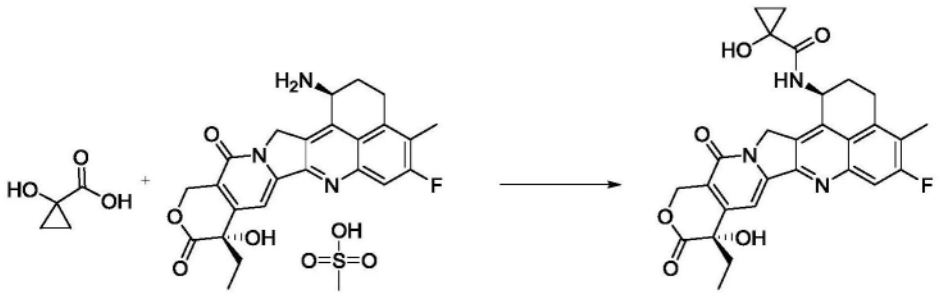
[0495] 实施例1

[0496] N-((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-1-羟基环丙烷-1-甲酰胺1



1

[0497]



1a 1b 1

[0498] 向依喜替康甲磺酸盐1b(2.0mg,3.76μmol,采用专利申请"EP0737686A1"公开的方法制备而得)中添加1mL N,N-二甲基甲酰胺,冰水浴冷却至0-5℃,滴加一滴三乙胺,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入1-羟基环丙基甲酸1a(1.4mg,3.7μmol,采用公知的方法"Tetrahedron Letters,25(12),1269-72;1984"制备而得)和4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(3.8mg,13.7μmol),加毕,在0-5℃搅拌反应2小时。向反应液中加入5mL水淬灭反应,用乙酸乙酯(8mL×3)萃取反应液,合并有机相,用饱和氯化钠溶液(5mL×2)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,将滤液减压浓缩,用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物1(1.6mg,产率:82.1%)。

[0499] MS m/z(ESI):520.2[M+1]

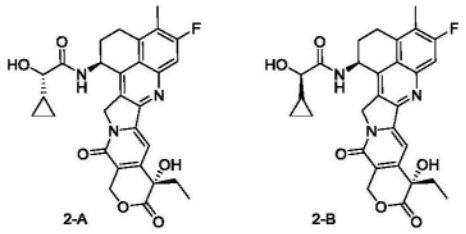
[0500] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.90-7.84(m,1H),7.80-7.68(m,1H),5.80-5.70(m,1H),5.62-5.54(m,2H),5.44-5.32(m,2H),5.28-5.10(m,2H),3.40-3.15(m,3H),2.44(s,3H),

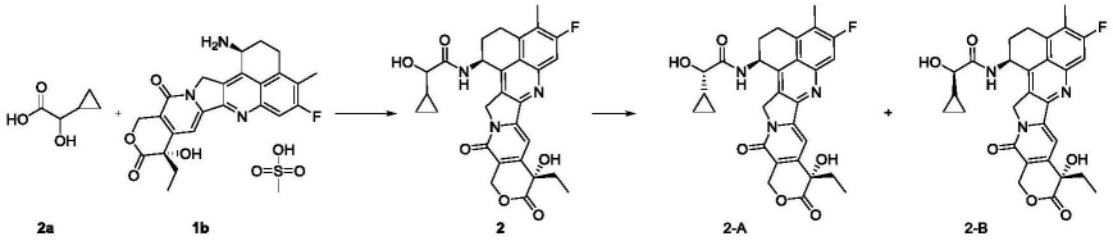
2.23(t,1H),2.06-1.75(m,2H),1.68-1.56(m,1H),1.22-1.18(m,2H),1.04-0.98(m,2H),0.89(t,3H)。

[0501] 实施例2

[0502] (S)-2-环丙基-N-((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-2-羟基乙酰胺2-A(R)-2-环丙基-N-((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-2-羟基乙酰胺

[0503] 2-B





2a 1b 2 2-A 2-B

[0504] 向1b(4mg,7.53μmol)中加入2mL乙醇和0.4mL N,N-二甲基甲酰胺,氩气置换三次,冰水浴冷却至0-5℃,滴加0.3mL N-甲基吗啉,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入2-环丙基-2-羟基乙酸2a(2.3mg,19.8μmol,采用专利申请"WO2013106717"公开的方法制备而得)、1-羟基苯并三唑(3mg,22.4μmol)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(4.3mg,22.4μmol),加毕,在0-5℃搅拌反应1小时。撤去冰水浴,加热至30℃搅拌2小时。反应液减压浓缩,所得到的粗品化合物2用高效液相色谱法纯化(分离条件:色谱柱:XBridge Prep C18 OBD 5μm19*250mm;流动相:A-水(10mmol NH_4OAc),B-乙腈,梯度洗脱,流速:18mL/min),收集其相应组分,减压浓缩,得到标题产物(2-A:1.5mg,2-B:1.5mg)。

[0505] MS m/z(ESI):534.0[M+1]。

[0506] 单一构型化合物2-B(较短保留时间)

[0507] UPLC分析:保留时间1.06分钟,纯度:88%(色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC181.7μm 2.1*50mm,流动相:A-水(5mmol NH_4OAc),B-乙腈)。

[0508] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.37(d,1H),7.76(d,1H),7.30(s,1H),6.51(s,1H),5.58-5.56(m,1H),5.48(d,1H),5.41(s,2H),5.32-5.29(m,2H),3.60(t,1H),3.19-3.13(m,1H),2.38(s,3H),2.20-2.14(m,1H),1.98(q,2H),1.87-1.83(m,1H),1.50-1.40(m,1H),1.34-1.28(m,1H),0.86(t,3H),0.50-0.39(m,4H)。

[0509] 单一构型化合物2-A(较长保留时间)

[0510] UPLC分析:保留时间1.10分钟,纯度:86%(色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC181.7μm 2.1*50mm,流动相:A-水(5mmol NH_4OAc),B-乙腈)。

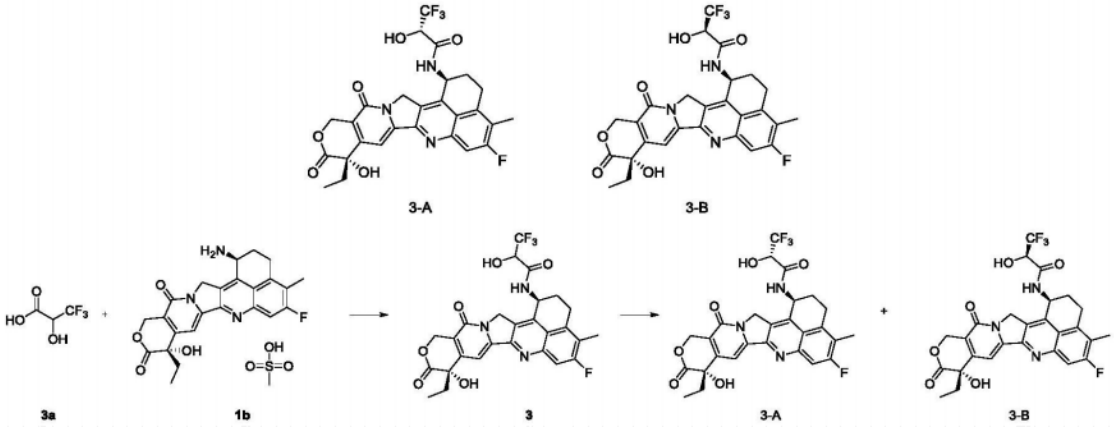
[0511] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.35(d,1H),7.78(d,1H),7.31(s,1H),6.52(s,1H),

5.58-5.53(m,1H),5.42(s,2H),5.37(d,1H),5.32(t,1H),3.62(t,1H),3.20-3.15(m,2H),2.40(s,3H),2.25-2.16(m,1H),1.98(q,2H),1.87-1.82(m,1H),1.50-1.40(m,1H),1.21-1.14(m,1H),0.87(t,3H),0.47-0.35(m,4H)。

[0512] 实施例3

[0513] (S)-N-((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-3,3,3-三氟-2-羟基丙酰胺3-A

[0514] (R)-N-((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-3,3,3-三氟-2-羟基丙酰胺3-B

[0515] 

[0516] 向1b(5.0mg,9.41μmol)中添加2mL乙醇和0.4mL N,N-二甲基甲酰胺,冰水浴冷却至0-5℃,滴加0.3mL N-甲基吗啡啉,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入3,3,3-三氟-2-羟基丙酸3a(4.1mg,28.4μmol,供应商Alfa)、1-羟基苯并三唑(3.8mg,28.1μmol)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(5.4mg,28.2μmol),加毕,在0-5℃搅拌反应10分钟。撤去冰水浴,加热至30℃搅拌8小时。反应液减压浓缩,所得到的粗品化合物3用高效液相色谱法纯化(分离条件:色谱柱:XBridge Prep C18 OBD 5μm 19*250mm;流动相:A-水(10mmol NH_4OAc):B-乙腈,梯度洗脱,流速:18mL/min),收集其相应组分,减压浓缩,得到标题产物(3-A:1.5mg,3-B:1.5mg)。

[0517] MS m/z(ESI):561.9[M+1]。

[0518] 单一构型化合物(较短保留时间)

[0519] UPLC分析:保留时间1.11分钟,纯度:88%(色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC181.7μm 2.1*50mm,流动相:A-水(5mmol NH_4OAc),B-乙腈)。

[0520] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.94(d,1H),7.80(d,1H),7.32(s,1H),7.20(d,1H),6.53(s,1H),5.61-5.55(m,1H),5.45-5.23(m,3H),5.15-5.06(m,1H),4.66-4.57(m,1H),3.18-3.12(m,1H),2.40(s,3H),2.26-2.20(m,1H),2.16-2.08(m,1H),2.02-1.94(m,1H),1.89-1.82(m,1H),1.50-1.40(m,1H),0.87(t,3H)。

[0521] 单一构型化合物(较长保留时间)

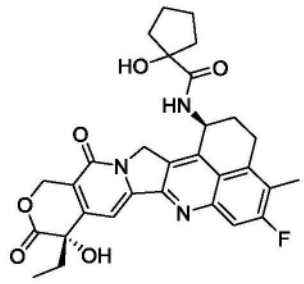
[0522] UPLC分析:保留时间1.19分钟,纯度:90%(色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC181.7μm 2.1*50mm,流动相:A-水(5mmol NH_4OAc),B-乙腈)。

[0523] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.97(d,1H),7.80(d,1H),7.31(s,1H),7.16(d,1H),

6.53(s,1H),5.63-5.55(m,1H),5.45-5.20(m,3H),5.16-5.07(m,1H),4.66-4.57(m,1H),3.18-3.12(m,1H),2.40(s,3H),2.22-2.14(m,1H),2.04-1.95(m,2H),1.89-1.82(m,1H),1.50-1.40(m,1H),0.87(t,3H)。

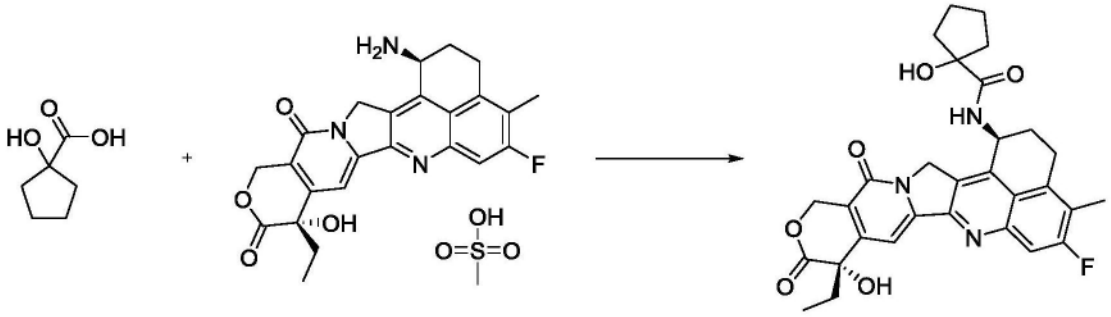
[0524] 实施例4

[0525] N-((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-1-羟基环戊烷-1-甲酰胺4



4

[0526]



4a 1b 4

[0527] 向1b(3.0mg,5.64μmol)中添加1mL N,N-二甲基甲酰胺,冰水浴冷却至0-5℃,滴加一滴三乙胺,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入1-羟基-环戊烷甲酸4a(2.2mg,16.9μmol,采用专利申请"WO2013106717"公开的方法制备而得)和4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(4.7mg,16.9μmol),加毕,在0-5℃搅拌反应1小时。向反应液中加入5mL水淬灭反应,用乙酸乙酯(10mL×3)萃取反应液,合并有机相,用饱和氯化钠溶液(5mL×2)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,将滤液减压浓缩,用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物4(2.5mg,产率:80.9%)。

[0528] MS m/z(ESI):548.0[M+1]。

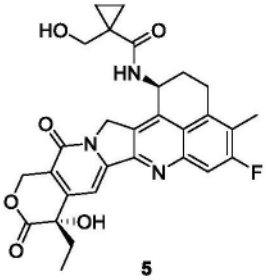
[0529] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.73-7.62(m,2H),5.75-5.62(m,1H),5.46-5.32(m,2H),5.26-5.10(m,1H),3.30-3.10(m,1H),2.43(s,3H),2.28-2.20(m,2H),2.08-1.84(m,8H),1.69-1.58(m,2H),1.04-1.00(m,2H),0.89(t,3H)。

[0530] 实施例5

[0531] N-((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

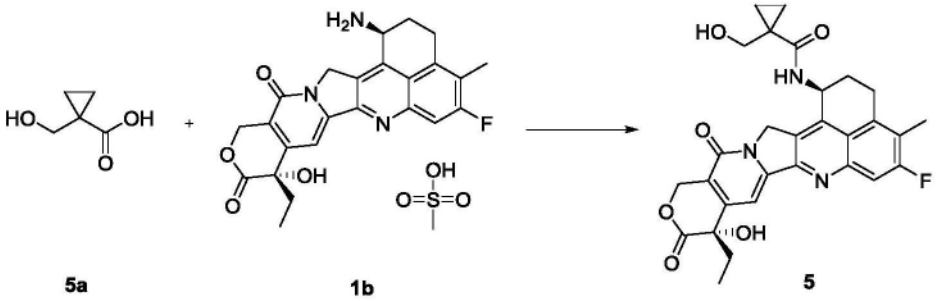
[0532] -1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-1-(羟甲基)环丙烷-1-

[0533] 甲酰胺5



5

[0534]



5a 1b 5

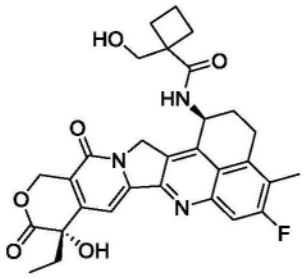
[0535] 向1b(2.0mg,3.76μmol)中添加1mL N,N-二甲基甲酰胺,冰水浴冷却至0-5℃,滴加一滴三乙胺,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入1-(羟甲基)-环戊烷甲酸5a(0.87mg,7.5μmol,采用专利申请"WO201396771"公开的方法制备而得)和4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(2mg,7.24μmol),加毕,在0-5℃搅拌反应2小时。向反应液中加入5mL水淬灭反应,用乙酸乙酯(8mL×3)萃取反应液,合并有机相,用饱和氯化钠溶液(5mL×2)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,将滤液减压浓缩,用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物5(1.0mg,产率:50%)。

[0536] MS m/z(ESI):533.9[M+1]。

[0537] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.07(s,1H),7.23-7.18(m,2H),6.71-6.64(m,1H),6.55-6.51(m,1H),5.36-5.27(m,2H),4.67-4.61(m,2H),3.53-3.48(m,1H),3.30-3.22(m,2H),3.18-3.13(m,1H),2.71-2.61(m,2H),2.35-2.28(m,1H),2.04-1.91(m,4H),1.53-1.40(m,3H),0.91-0.75(m,4H)。

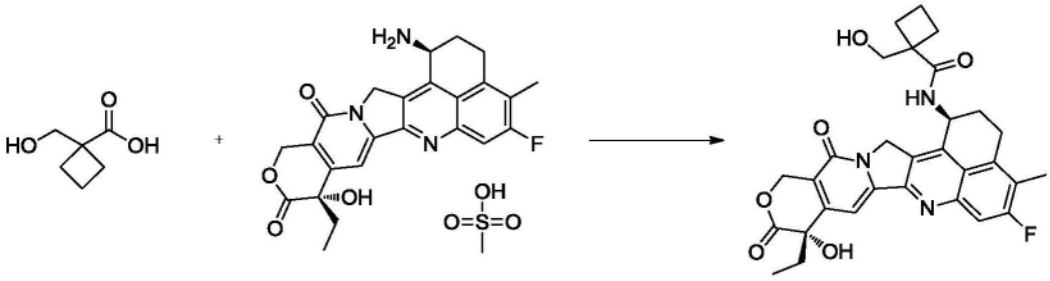
[0538] 实施例6

[0539] N-((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-1-(羟基甲基)环丁烷-1-甲酰胺6



6

[0540]



6a 1b 6

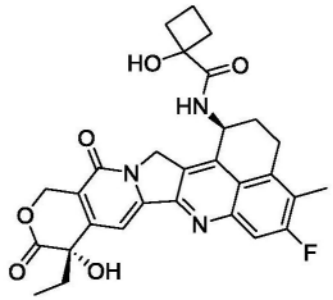
[0541] 向1b(3.0mg,5.64μmol)中添加1mL N,N-二甲基甲酰胺,冰水浴冷却至0-5℃,滴加一滴三乙胺,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入1-(羟基甲基)环丁烷-1-甲酸6a(2.2mg,16.9μmol;采用文献“Journal of the American Chemical Society,2014,vol.136,#22,p.8138-8142”公开的方法制备而得)和4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(4.7mg,16.9μmol),加毕,在0-5℃搅拌反应1小时。向反应液中加入5mL水淬灭反应,用乙酸乙酯(10mL×3)萃取反应液,合并有机相,用饱和氯化钠溶液(5mL×2)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,将滤液减压浓缩,用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物6(2.1mg,产率:67.9%)。

[0542] MS m/z(ESI):548.0[M+1]。

[0543] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ7.85-7.62(m,1H),6.88(br,1H),5.87-5.48(m,2H),5.47-5.33(m,1H),5.31-5.06(m,1H),4.25-3.91(m,2H),3.25(br,1H),2.60-2.32(m,3H),2.23(t,1H),2.15-1.95(m,3H),1.70-1.56(m,2H),1.41-1.17(m,9H),1.03(s,1H),0.95-0.80(m,2H)。

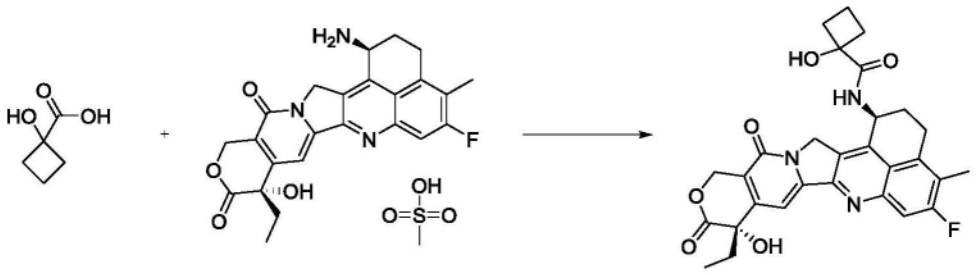
[0544] 实施例7

[0545] N-((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-1-羟基环丁烷-1-甲酰胺7



7

[0546]



7a 1b 7

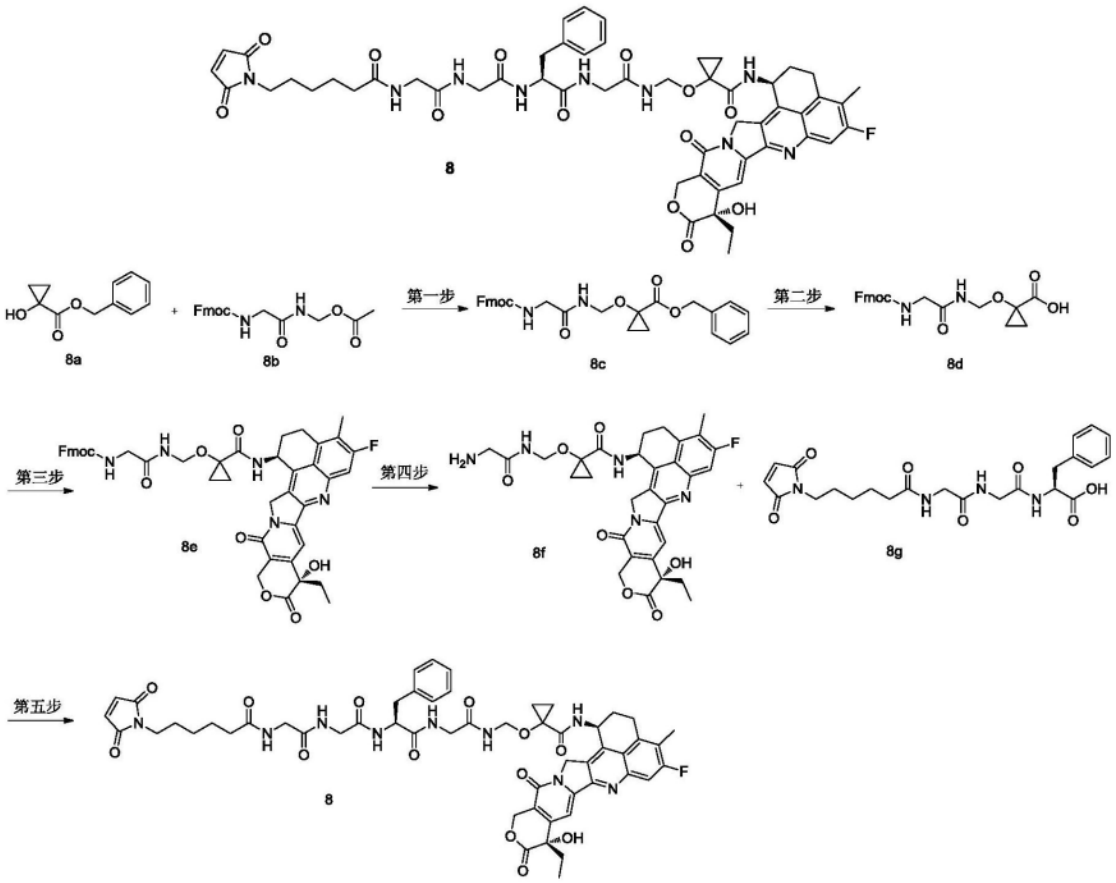
[0547] 向1b(3.0mg,5.64μmol)中添加2mL乙醇和0.4mL N,N-二甲基甲酰胺,冰水浴冷却至0-5℃,滴加0.3mL N-甲基吗啡啉,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入1-羟基环丁烷甲酸7a(2.0mg,17.22μmol,供应商药石),1-羟基苯并三唑(2.3mg,17.0μmol)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(3.2mg,16.7μmol),加毕,在0-5℃搅拌反应10分钟。撤去冰水浴,常温搅拌2小时。反应液减压浓缩,用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物7(2.5mg,产率:83.1%)。

[0548] MS m/z(ESI):534.0[M+1]。

[0549] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.28(d,1H),7.75(d,1H),7.29(s,1H),6.51(s,1H),6.12(s,1H),5.59-5.51(m,1H),5.41(s,2H),5.20-5.01(m,2H),3.27-3.17(m,1H),3.15-3.05(m,1H),2.71-2.63(m,1H),2.37(s,3H),2.12-2.05(m,1H),2.03-1.94(m,2H),1.92-1.78(m,4H),1.50-1.42(m,1H),0.90-0.83(m,4H)。

[0550] 实施例8

[0551] 1-(((S)-7-苄基-20-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3,6,9,12,15-五氧代-2,5,8,11,14-五氮杂二十烷基)氧基)-N-((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)环丙烷-1-甲酰胺8



[0552]

[0553] 第一步

[0554] 1-((2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲氧基)环丙烷-1-羧酸苄酯8c

[0555] 将1-羟基环丙烷-1-羧酸苄酯8a(104mg,0.54mmol;采用专利申请“US2005/20645”公开的方法制备而得)和2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲基乙酸酯8b(100mg,0.27mmol;采用专利申请“CN105829346A”公开的方法制备而得)加入反应瓶,加入5mL四氢呋喃,氩气置换三次,冰水浴降温至0-5℃,加入叔丁醇钾(61mg,0.54mmol),撤去冰浴,升至室温搅拌10分钟,加入20mL冰水,用乙酸乙酯(5mL×2)和氯仿(5mL×5)萃取,合并有机相并浓缩。所得残余物溶于3mL 1,4-二氧六环中,加入0.6mL水,加入碳酸氢钠(27mg,0.32mmol)和氯甲酸-9-芴甲酯(70mg,0.27mmol),室温搅拌1小时。加入20mL水,用乙酸乙酯(8mL×3)萃取,有机相用饱和氯化钠溶液(20mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩,用硅胶柱色谱法以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物8c(100mg,产率:73.6%)。

[0556] MS m/z(ESI):501.0[M+1]。

[0557] 第二步

[0558] 1-((2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲氧基)环丙烷-1-羧酸8d

[0559] 将8c(50mg,0.10mmol)溶于3mL四氢呋喃和乙酸乙酯(V:V=2:1)混合溶剂中,加入钯碳(25mg,含量10%),氢气置换三次,室温搅拌反应1小时。反应液用硅藻土过滤,滤饼用四氢呋喃淋洗,滤液浓缩,得到标题产物8d(41mg,产率:100%)。MS m/z(ESI):411.0[M+1]。

[0560] 第三步

[0561] (9H-芴-9-基)甲基(2-(((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基羰基)环丙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基甲酸酯8e

[0562] 将1b(7mg,0.013mmol)加入反应瓶,加入1mL N,N-二甲基甲酰胺,氩气置换三次,冰水浴降温至0-5℃,滴加一滴三乙胺,加入8d(7mg,0.017mmol)的0.5mL N,N-二甲基甲酰胺溶液,加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(7mg,0.026mmol),冰浴搅拌反应35分钟。加入10mL水,用乙酸乙酯(5mL×3)萃取,有机相用饱和氯化钠溶液(10mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩,用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物8e(8.5mg,产率78.0%)。

[0563] MS m/z(ESI):828.0[M+1]。

[0564] 第四步

[0565] 1-((2-氨基乙酰氨基)甲氧基)-N-((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)环丙烷-1-甲酰胺8f

[0566] 将8e(4mg,4.84μmol)溶于0.2mL二氯甲烷中,加入0.1mL二乙胺,室温搅拌2小时。反应液减压浓缩,加入2mL甲苯减压浓缩,重复两次,加入3mL正己烷打浆,倾倒出上层正己烷,重复三次,减压浓缩得到粗品标题产物8f(2.9mg),产品不经纯化直接用于下一步反应。

[0567] MS m/z(ESI):606.0[M+1]。

[0568] 第五步

[0569] 1-(((S)-7-苄基-20-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3,6,9,12,15-五氧代-2,5,8,11,14-五氮杂二十烷基)氧基)-N-((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)环丙烷-1-甲酰胺8

[0570] 将粗品8f(2.9mg,4.84μmol)溶于0.5mL N,N-二甲基甲酰胺,氩气置换三次,冰水浴降温至0-5℃,加入(S)-2(-2-(-2-(6-(2,5-二氧代-1H-吡咯-1-基)已酰氨基)乙酰氨基)乙酰氨基)-3-苯基丙酸8g(2.7mg,5.80μmol,采用专利申请"EP2907824"公开的方法制备而得)的0.3mL N,N-二甲基甲酰胺溶液,加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(2.7mg,9.67μmol),冰浴搅拌反应30分钟,撤去冰浴,升至室温搅拌15分钟。反应液进行高效液相色谱法纯化(分离条件:色谱柱:XBridge Prep C18 OBD 5μm 19*250mm;流动相:A-水(10mmol NH_4OAc):B-乙腈,梯度洗脱,流速:18mL/min),收集其相应组分,减压浓缩得到标题产物8(2mg,产率:39.0%)。

[0571] MS m/z(ESI):1060.0[M+1]。

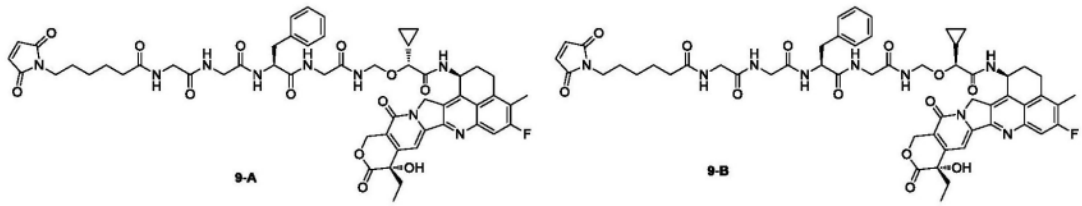
[0572] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ9.01(d,1H),8.77(t,1H),8.21(t,1H),8.08-7.92(m,2H),7.73(d,1H),7.28(s,1H),7.24-7.07(m,4H),6.98(s,1H),6.50(s,1H),5.61(q,1H),5.40(s,2H),5.32(t,1H),5.12(q,2H),4.62(t,1H),4.52(t,1H),4.40-4.32(m,1H),3.73-3.47(m,8H),3.16-3.04(m,2H),2.89(dd,1H),2.69-2.55(m,2H),2.37-2.23(m,4H),2.12-1.93(m,4H),1.90-1.74(m,2H),1.52-1.38(m,4H),1.33-1.11(m,5H),0.91-0.81(m,4H)。

[0573] 实施例9

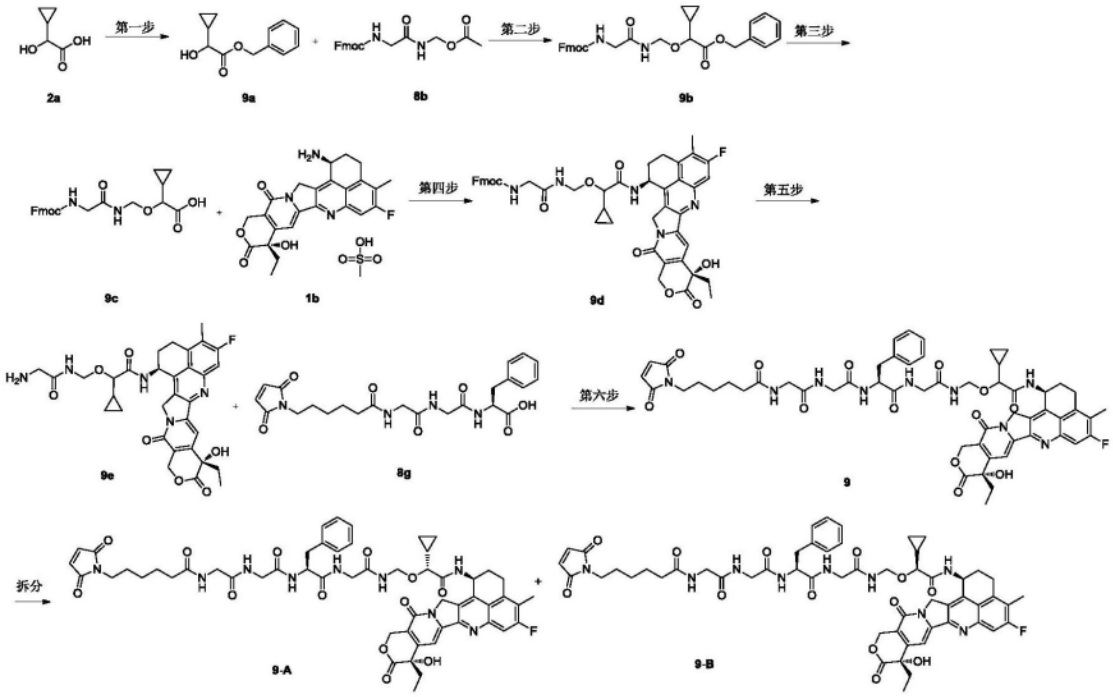
[0574] N-((2R,10S)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-

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]吲哚嗪并[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9-A

[0575] N-((2S,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]吲哚嗪并[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9-B



[0576]



[0577] 第一步

[0578] 2-环丙基-2-羟基乙酸苄酯9a

[0579] 将2a(1.3g,11.2mmol;采用专利申请"WO2013/106717"公开的方法制备而得)溶于50mL乙腈中,依次加入碳酸钾(6.18g,44.8mmol),溴化苄(1.33mL,11.2mmol)和四丁基碘化铵(413mg,1.1mmol)。将反应液室温搅拌48小时,通过硅藻土过滤,滤饼用乙酸乙酯(10mL)淋洗,合并滤液减压浓缩,用硅胶柱色谱法以展开剂体系C纯化所得残余物,得到标题产物9a(2g,产率:86.9%)。

[0580] 第二步

[0581] 10-环丙基-1-(9H-芴-9-基)-3,6-二氧代-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一-11-酸苄酯9b

[0582] 将9a(120.9mg,0.586mmol)和8b(180mg,0.489mmol)加入反应瓶,加入4mL四氢呋喃,氩气置换三次,冰水浴降温至0-5℃,加入叔丁醇钾(109mg,0.98mmol),撤去冰浴,升至

室温搅拌40分钟,加入10mL冰水,用乙酸乙酯(20mL×2)和氯仿(10mL×5)萃取,合并有机相并浓缩。所得残余物溶于4mL二氧六环中,加入2mL水,加入碳酸氢钠(49.2mg,0.586mmol)和氯甲酸-9-芴甲酯(126mg,0.49mmol),室温搅拌2小时。加入20mL水,用乙酸乙酯(10mL×3)萃取,有机相用饱和氯化钠溶液(20mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩。用硅胶柱色谱法以展开剂体系C纯化所得残余物,得到标题产物9b(48mg,产率:19%)。MS m/z(ESI):515.0[M+1]。

[0583] 第三步

[0584] 10-环丙基-1-(9H-芴-9-基)-3,6-二氧代-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一-11-酸9c

[0585] 将9b(20mg,0.038mmol)溶于4.5mL四氢呋喃和乙酸乙酯(V:V=2:1)混合溶剂中,加入钯碳(12mg,含量10%,干型),氢气置换三次,室温搅拌反应1小时。反应液用硅藻土过滤,滤饼用乙酸乙酯淋洗,滤液浓缩,得到粗品标题产物9c(13mg),产品不经纯化直接进行下一步反应。

[0586] MS m/z(ESI):424.9[M+1]。

[0587] 第四步

[0588] (9H-芴-9-基)甲基(2-(((1-环丙基-2-(((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基甲酸酯9d

[0589] 将1b(10mg,18.8μmol)加入反应瓶,加入1mL N,N-二甲基甲酰胺,氩气置换三次,冰水浴降温至0-5℃,滴加一滴三乙胺,加入粗品9c(13mg,30.6μmol),加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(16.9mg,61.2μmol),冰浴搅拌反应40分钟。加入10mL水,用乙酸乙酯(10mL×3)萃取,合并有机相。有机相用饱和氯化钠溶液(10mL×2)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩。用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物9d(19mg,产率:73.6%)。

[0590] MS m/z(ESI):842.1[M+1]。

[0591] 第五步

[0592] 2-((2-氨基乙酰氨基)甲氧基)-2-环丙基-N-((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]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)乙酰胺9e

[0593] 将9d(19mg,22.6μmol)溶于2mL二氯甲烷中,加入1mL二乙胺,室温搅拌2小时。反应液减压浓缩,加入1mL甲苯并减压浓缩,重复两次。往残余物中加入3mL正己烷打浆,静置后倾倒出上层清液,保留固体。将固体残余物减压浓缩,油泵拉干得到粗品标题产物9e(17mg),产品不经纯化直接用于下一步反应。

[0594] MS m/z(ESI):638.0[M+18]。

[0595] 第六步

[0596] 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]吲哚嗪并[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9-A

[0597] N-((2S,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]吲哚嗪并[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9-B

[0598] 将粗品9e(13.9mg,22.4μmol)溶于0.6mL N,N-二甲基甲酰胺,氩气置换三次,冰水浴降温至0-5℃,加入8g(21.2mg,44.8μmol)的0.3mL N,N-二甲基甲酰胺溶液,加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(18.5mg,67.3μmol),冰浴搅拌反应10分钟,撤去冰浴,升至室温搅拌1小时,反应生成化合物9。反应液进行高效液相色谱法纯化(分离条件:色谱柱:XBridge Prep C18 OBD 5μm 19*250mm;流动相:A-水(10mmol NH_4OAc):B-乙腈,梯度洗脱,流速:18mL/min),收集其相应组分,减压浓缩,得到标题产物(9-A:2.4mg,9-B:1.7mg)。

[0599] MS m/z(ESI):1074.4[M+1]。

[0600] 单一构型化合物9-A(较短保留时间):

[0601] UPLC分析:保留时间1.14分钟,纯度:85%(色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC18 1.7μm 2.1*50mm,流动相:A-水(5mmol NH_4OAc),B-乙腈)。

[0602] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.60(t,1H),8.51-8.49(d,1H),8.32-8.24(m,1H),8.13-8.02(m,2H),8.02-7.96(m,1H),7.82-7.75(m,1H),7.31(s,1H),7.26-7.15(m,4H),6.99(s,1H),6.55-6.48(m,1H),5.65-5.54(m,1H),5.41(s,2H),5.35-5.15(m,3H),4.74-4.62(m,1H),4.54-4.40(m,2H),3.76-3.64(m,4H),3.62-3.48(m,2H),3.20-3.07(m,2H),3.04-2.94(m,1H),2.80-2.62(m,1H),2.45-2.30(m,3H),2.25-2.15(m,2H),2.15-2.04(m,2H),1.93-1.78(m,2H),1.52-1.39(m,3H),1.34-1.12(m,5H),0.87(t,3H),0.64-0.38(m,4H)。

[0603] 单一构型化合物9-B(较长保留时间):

[0604] UPLC分析:保留时间1.16分钟,纯度:89%(色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC181.7μm 2.1*50mm,流动相:A-水(5mmol NH_4OAc),B-乙腈)。

[0605] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.68-8.60(m,1H),8.58-8.50(m,1H),8.32-8.24(m,1H),8.13-8.02(m,2H),8.02-7.94(m,1H),7.82-7.75(m,1H),7.31(s,1H),7.26-7.13(m,3H),6.99(s,1H),6.55-6.48(m,1H),5.60-5.50(m,1H),5.41(s,2H),5.35-5.15(m,2H),4.78-4.68(m,1H),4.60-4.40(m,2H),3.76-3.58(m,4H),3.58-3.48(m,1H),3.20-3.10(m,2H),3.08-2.97(m,2H),2.80-2.72(m,2H),2.45-2.30(m,3H),2.25-2.13(m,2H),2.13-2.04(m,2H),2.03-1.94(m,2H),1.91-1.78(m,2H),1.52-1.39(m,3H),1.34-1.12(m,4H),0.91-0.79(m,3H),0.53-0.34(m,4H)。

[0606] 三、抗Claudin18.2抗体ADC偶联物的制备

[0607] ADC原液药物载药量分析

[0608] 一、UV-HPLC方法

[0609] 本披露部分ADC实施例的DAR值n计算方法采用了UV-HPLC,具体如下:

[0610] 1、测定方法:

[0611] 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后,扣除溶剂空白后,再将装有供试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。

[0612] 2、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加和,即:

[0613] (1)$A_{280nm}=\varepsilon_{mab-280}bC_{mab}+\varepsilon_{Drug-280}bC_{Drug}$

[0614] $\varepsilon_{Drug-280}$:药物在280nm平均摩尔消光系数5100;

[0615] C_{Drug}:药物的浓度;

[0616] $\varepsilon_{mab-280}$:单抗原液在280nm平均摩尔消光系数214600;

[0617] C_{mab}:单抗原液的浓度;

[0618] b:光程长度为1cm。

[0619] 同理可以得到样品在370nm下的总吸光值方程:

[0620] (2)$A_{370nm}=\varepsilon_{mab-370}bC_{mab}+\varepsilon_{Drug-370}bC_{Drug}$

[0621] $\varepsilon_{Drug-370}$:药物在370nm平均摩尔消光系数19000;

[0622] C_{Drug}:药物的浓度;

[0623] $\varepsilon_{mab-370}$:单抗原液在370nm消光系数为0;

[0624] C_{mab}:单抗原液的浓度;

[0625] b:光程长度为1cm。

[0626] 由⑴和⑵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。

[0627] 药物载量=C_{Drug}/C_{mab}。

[0628] 二、RP-HPLC方法

[0629] 本披露部分ADC实施例的DAR值计算方法采用了RP-HPLC(反相高效液相色谱),具体如下:

[0630] 1、测定方法:

[0631] 裸抗(未缀合的抗体)和供测试ADC样品(浓度为1mg/mL),加入4μL DDT(sigma)还原,37℃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-S1000A8μm 4.6*250mm,柱温:80℃;DAD检测器波长280nm;流速:1mL/min;进样量为:40μL;之后通过样品与裸抗的谱图比对,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n。

[0632] 2、溶液配制

[0633] 1)0.25M DTT溶液:

[0634] 配制示例:取DTT 5.78mg,加入150μL纯化水充分溶解后,配得0.25M DTT溶液,-20℃保存。

[0635] 2)流动相A(0.1% TFA水溶液):

[0636] 配制示例:量筒量取1000mL纯化水,加入1mL TFA(sigma),充分混匀后使用,2-8℃保存14天。

[0637] 3)流动相B(0.1% TFA乙腈溶液):

[0638] 配制示例:量筒量取1000mL乙腈,加入1mL TFA,充分混匀后使用,2-8℃保存14天。

[0639] 3、数据分析

[0640] 通过样品与裸抗的谱图比对,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(n)。

[0641] 计算公式如下:

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

[0642]

[0643] LC峰面积总和=LC峰面积+LC+1峰面积

[0644] 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

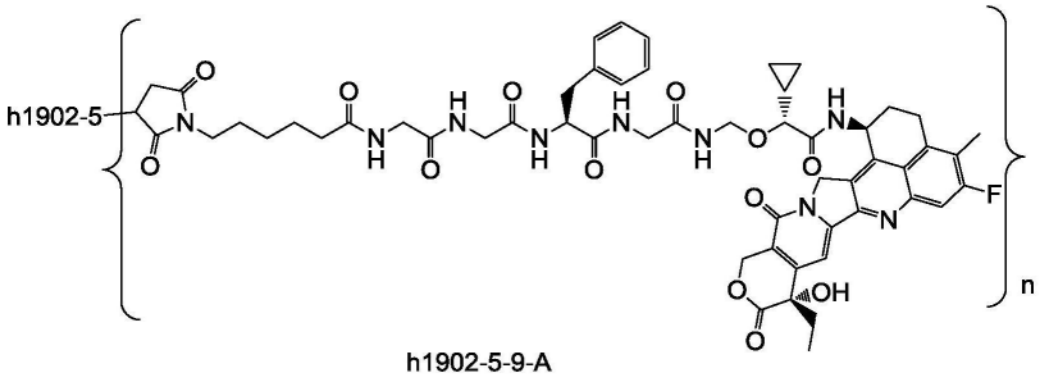
[0645] LC DAR=Σ(连接药物数*峰面积百分比)/LC峰面积总和

[0646] HC DAR=Σ(连接药物数*峰面积百分比)/HC峰面积总和

[0647] DAR=LC DAR+HC DAR。

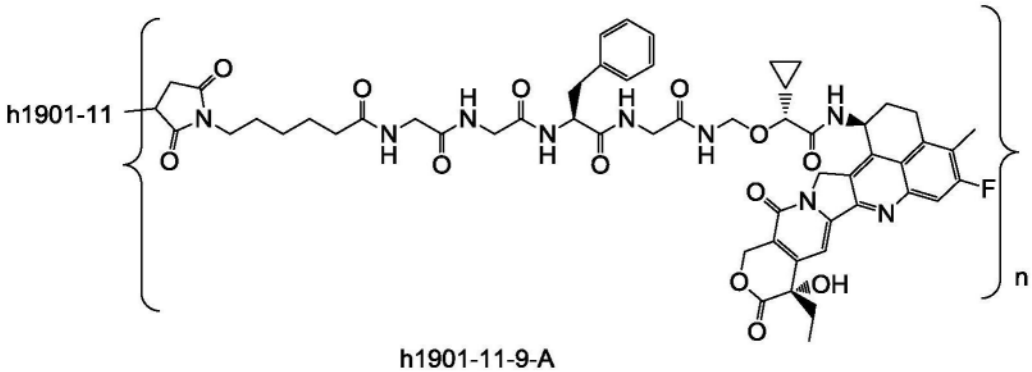
[0648] Claudin18.2抗体-药物偶联物制备实施例

[0649] 实施例3-1、3-2:ADC-1、ADC-2



h1902-5-9-A

[0650]



h1901-11-9-A

[0651] 在37℃条件下,向含抗体h1902-5的PBS缓冲液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;10.0mg/mL,320.0mL,21.62μmol)中加入三(2-羧乙基)膦(TCEP)水溶液(10mM,11.03mL,110.3μmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0652] 将化合物9-A(350mg,303mol溶解于13.2mL乙腈和6.6mL DMSO中,加入到降温至25

℃的上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃下振荡反应3小时,停止反应。

[0653] 将得到的反应液先后用5L的PBS缓冲液(50mM,pH=6.5,4%乙腈,2% DMSO)和5L的琥珀酸缓冲液(10mM,pH=5.3)进行超滤膜纯化,除去小分子,加入蔗糖至60mg/mL、吐温-20至0.2mg/mL,最终制备得到通式抗体药物偶联物h1902-5-9-A的示例性产物ADC-1(10mM、pH=5.3琥珀酸;10mg/mL,2.626g)。收率:81.81%。

[0654] UV-HPLC计算平均值:n=6.8。

[0655] 使用上述方法,可以用抗体h1901-11代替h1902-5,和化合物9-A制备得到通式抗体药物偶联物h1901-11-9-A的示例性产物ADC-2,DAR值n=7.1。

[0656] 实施例3-3ADC-3

[0657] 在37℃条件下,向抗体h1901-11的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;10.0mg/mL,1mL,67.5nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM,10.1μL,101nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0658] 将化合物9-A(0.58mg,540nmol)溶解于34μL DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃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),得到抗体药物偶联物h1901-11-9-A的示例性产物ADC-3的PBS缓冲液(0.72mg/mL,11.2mL),于4℃储存。RP-HPLC计算平均值:n=2.51。

[0659] 实施例3-4ADC-4

[0660] 在37℃条件下,向抗体h1901-11的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;10.0mg/mL,1mL,67.5nmol)加入配置好的的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM,16.9μL,169nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0661] 将化合物9-A(0.73mg,680nmol)溶解于43μL DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃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),得到抗体药物偶联物h1901-11-9-A的示例性产物ADC-4的PBS缓冲液(0.62mg/mL,12.5mL),于4℃储存。RP-HPLC计算平均值:n=4.06。

[0662] 实施例3-5ADC-5

[0663] 在37℃条件下,向抗体h1901-11的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;10.0mg/mL,1mL,67.5nmol)加入配置好的的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM,35.8μL,358nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0664] 将化合物9-A(1.09mg,1015nmol)溶解于64μL DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃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),得到抗体药物偶联物h1901-11-9-A的示例性产物ADC-5的PBS缓冲液(0.54mg/mL,12.5mL),于4℃储存。RP-HPLC计算平均值:n=6.8。

[0665] 实施例3-6ADC-6

[0666] 在37℃条件下,向抗体h1902-5的PBS缓冲水溶液(pH＝6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;10.0mg/mL,1.08mL,72.9nmol)加入配置好的的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM,10.9μL,109nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0667] 将化合物9-A(0.63mg,587nmol)溶解于40μL DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃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h1902-5-9-A的示例性产物ADC-6的PBS缓冲液(0.7mg/mL,13.0mL),于4℃储存。RP-HPLC计算平均值:n＝2.69。

[0668] 实施例3-7ADC-7

[0669] 在37℃条件下,向抗体h1902-5的PBS缓冲水溶液(pH＝6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;10.0mg/mL,1.08mL,72.9nmol)加入配置好的的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM,18.3μL,183nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0670] 将化合物9-A(0.79mg,736nmol)溶解于50μL DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃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h1902-5-9-A的示例性产物ADC-7的PBS缓冲液(0.6mg/mL,14.0mL),于4℃储存。RP-HPLC计算平均值:n＝4.25。

[0671] 实施例3-8ADC-8

[0672] 在37℃条件下,向抗体h1902-5的PBS缓冲水溶液(pH＝6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;10.0mg/mL,1.08mL,72.9nmol)加入配置好的的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM,38.7μL,387nmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0673] 将化合物9-A(1.18mg,1099nmol)溶解于70μL DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃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h1902-5-9-A的示例性产物ADC-8的PBS缓冲液(0.56mg/mL,14.2mL),于4℃储存。RP-HPLC计算平均值:n＝7.01。

[0674] 实施例3-9ADC-9

[0675] 在12℃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2.5mM 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,1.16L1.99mmol),置于恒温水浴锅中,于12℃下搅拌反应2小时,停止反应,得到中间体I溶液。

[0676] 将化合物9-A(4.72g,4.39mmol)溶解于0.38L 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0.38L 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℃下搅拌反应1小时,停止反应。

[0677] 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℃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h1902-5-9-A的示例性产物ADC-9。RP-HPLC计算平均值:n＝4.1。

[0678] 本实施例获得的载药量为非限制性实施例,本领域的技术人员根据反应条件和试剂的调整,获得不同DAR值(1-10,优选1-8,更优选2-8,2-7)的偶联物。

[0679] 生物学评价

[0680] 测试例1:细胞Cell水平ELISA结合实验

[0681] Cell based ELISA实验被用来检测Claudin18.2抗体的结合特性。将稳转表达Claudin18.2的NUGC4细胞培养于96孔细胞板中,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 7.4PBS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℃孵育箱孵育2.5小时或4℃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%r牛奶)稀释的不同浓度待测抗体,放于37℃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℃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10-15分钟,加入50μL/孔1M H_2SO_4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。

[0682] 表10杂交瘤抗体结合活性

[0683]

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

[0684] 表11mAb1901人源化抗体结合活性

[0685]

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

[0686] 表12mAb1902人源化抗体结合活性

[0687]

抗体	IMAB362	h1902-1	h1902-2	h1902-3	h1902-4	h1902-5
Emax	0.88	0.87	0.88	0.84	0.82	0.90
EC50(nM)	0.187	0.113	0.107	0.175	0.087	0.098
抗体	h1902-6	h1902-7	h1902-8	h1902-9	h1902-10	
Emax	0.78	0.75	0.89	0.75	0.89	
EC50(nM)	0.141	0.121	0.132	0.137	0.133	

[0688] 测试例2:抗体细胞水平结合实验

[0689] 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,100μL/孔加入96孔圆底板(Corning,3795)中。离心去除上清后加入50μL/孔用FACS缓冲液稀释的不同浓度待测Claudin18.2抗体,放于4℃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羊抗人IgG(H+L)(invitrogen,A-11013),放于4℃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。

[0690] 测试例3:抗体内吞实验

[0691] 将预标记了DyLight 488NHS Ester(thermofisher,46403)的待测Claudin18.2抗体,以5μg/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℃5% CO_2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。

[0692] 测试例4:基于流式细胞技术的抗体亲和力测定

[0693] 实验当天收集HEK293/hClaudin18.2细胞于U底96孔板中,每孔1～2×10^5个细胞。加入起始浓度5μg/mL,2×梯度稀释(12个浓度点)的人Claudin18.2抗体,4℃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100μL/孔FITC抗人IgG Fc抗体(200×),4℃避光孵育30分钟,用PBS+2%FBS清洗两遍后准备进行流式细胞仪检测。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-5MESF 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平均值,根据Quantum™FITC-5MESF 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细胞结合的人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13。

[0694] 表13人源化抗体细胞水平亲和力

[0695]

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

[0696] 测试例5:抗体的ADCC效应评价

[0697] 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25μL细胞(7500个/孔)。将抗体稀释在上述无酚红培养基中,配制成3×的抗体稀释液,向细胞板中加入25μL/孔的抗体。在37℃、5%CO_2培养箱中孵育0.5小时。

[0698] 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25μL细胞(7.5×10^4个细胞/孔)。在37℃、5% CO_2培养箱

中孵育6小时。

[0699] 向实验板的每个孔中加入75μL/孔的Bright-Glo(Promega,E2610),用酶标仪(PerkinElmer,VITOR3)检测化学发光(luminescence)。

[0700] 结果显示(见表14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。

[0701] 表14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)

[0702]

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

[0703] 测试例6:化合物对肿瘤细胞体外增殖抑制测试

[0704] 一、测试目的

[0705] 本实验的目的是为了检测本披露药物化合物,对U87MG细胞(胶质瘤细胞,中国科学院细胞库,Catalog#TCHu138)和SK-BR-3肿瘤细胞(人乳腺癌细胞,ATCC,货号HTB-30)体外增殖的抑制活性。以不同浓度的化合物体外处理细胞,经6天培养后,采用CTG(CellTiter-Glo®Luminescent Cell Viability Assay,Promega,货号:G7573)试剂对细胞的增值进行检测,根据IC50值评价该化合物的体外活性。

[0706] 二、实验方法

[0707] 下面以对U87MG细胞体外增殖抑制测试方法为例,用于举例说明本披露化合物对肿瘤细胞进行体外增殖抑制活性测试的方法。本方法同样适用于,但不限于对其它肿瘤细胞进行体外增殖抑制活性测试。

[0708] 1、细胞培养:U87MG和SK-BR-3细胞分别用10%FBS的EMEM培养基(GE,货号SH30024.01)和含10%FBS的McCoy's 5A培养基(Gibco,货号16600-108)培养。

[0709] 2、细胞准备。取对数生长期的U87MG和SK-BR-3细胞,用PBS(磷酸盐缓冲液,上海源培生物科技股份有限公司)洗涤1次之后,加入2-3mL胰蛋白酶(0.25% Trypsin-EDTA(1x),Gibico,Life Technologies公司)消化2-3分钟,待细胞消化完全后,加入10-15mL细胞培养液,将经过消化的细胞洗脱下来,1000rpm离心5分钟,弃上清,接着加入10-20mL细胞培养液将细胞重悬,制成单细胞悬液。

[0710] 3、细胞铺板。将U87MG和SK-BR-3单细胞悬液混匀,用细胞培养液分别调整活细胞密度至2.75×10^3cells/mL和8.25×10^3细胞/mL,将密度调整过后的细胞悬液混匀,以180μL/孔加入96孔细胞培养板。96孔板外周孔只加入200μL培养基。将培养板在培养箱培养24小时(37℃,5% CO_2)。

[0711] 4、化合物准备。用DMSO(二甲基亚砜,上海泰坦科技股份有限公司)溶解化合物,配制成初始浓度为10mM的存储液。

[0712] 小分子化合物的起始浓度为500nM,配药方法如下。

[0713] 在96孔U型底配药板第一列中分别加入30μL不同待测样品,样品浓度为100μM;第2列至第11列每孔中加入20μLDMSO。取第一列样品10μL至第二列20μL DMSO中,混匀,取10μL至第三列中,以此类推至第10列。将配药板中的药每孔取5μL至95μL EMEM培养基中,混匀,

待用。

[0714] ADC的起始浓度为10nM或500nM,配药方法如下。

[0715] 在96孔板第一列中分别加入100μL不同待测样品,样品浓度为100nM或5μM;第2列至第11列每孔中加入100μL PBS。取第一列样品50μL至第二列100μL PBS中,混匀,取50μL至第三列中,以此类推3倍稀释至第10列。

[0716] 5、加样操作。向培养板中加入20μL配置的不同浓度的待测样品,每个样品两复孔。将培养板在培养箱孵育6天(37℃,5% CO_2)。

[0717] 6、显色操作。取出96孔细胞培养板,向每孔加入90μL CTG溶液,室温孵育10分钟。

[0718] 7、读板操作。取出96孔细胞培养板,置于酶标仪(BMG labtech,PHERAstar FS)中,用酶标仪测定化学发光。

[0719] 三、数据分析

[0720] 用Microsoft Excel,Graphpad Prism 5对数据进行处理分析。实施例结果参见下表。

[0721] 表15本披露中的小分子片段对SK-BR-3细胞和U87细胞体外增殖抑制的IC_{50}值

[0722]

化合物实施例	IC_{50} (nM)	
	SK-BR-3	U87
实施例 1	0.12	0.23
实施例 2 2-B 较短保留时间	0.33	0.86
实施例 2 2-A 较长保留时间	8.11	2.31
实施例 3 较短保留时间	0.36	0.83
实施例 3 较长保留时间	1.67	2.98
实施例 4	1.9	/
实施例 5	/	4.81
实施例 6	/	1.83
实施例 7	/	1.95

[0723] 结论:本披露中的小分子片段对SK-BR-3细胞和U87细胞具有明显的增殖抑制活性,手性中心对化合物的抑制活性有一定影响。

[0724] 测试例7:ADC分子细胞活性实验

[0725] 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90μL/孔,约为2500个细胞每孔。37℃,5%CO_2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5μM,4×梯度稀释,9个浓度点,向细胞板中加入10μL/孔稀释好的样品。37℃,5% CO_2培养6天。第八天,取出细胞培养板,加入50μL/孔Cell Titer-Glo Reagent,室温放置2~3分钟,在PHERAstar FS读板器上读取荧光数值。利用GraphPad Prism软件进行数据分析。见表16。

[0726] 表16本披露的ADC分子体外细胞杀伤作用

[0727]

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)	Emax (%)	EC50 (nM)	Emax (%)	EC50(nM)	Emax (%)
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

[0728] 体内活性生物学评价

[0729] 测试例8:ADC分子体内药效评价

[0730] 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(5×10^6含50%matrigel基质胶/只),第0日分组,8只/组,共5组。平均瘤体积约84.41mm^3。

[0731] 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。

[0732] 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10g/0.1mL。

[0733] 每周测量2次瘤体积和体重,记录数据。

[0734] 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。

[0735] 肿瘤体积(V)计算公式为:$V=1/2\times L_{长}\times L_{短}^{2}$

[0736] 相对体积(RTV)=VT/V0

[0737] 抑瘤率(%)=(CRTV-TRTV)/CRTV(%)

[0738] 其中V0、VT分别为实验开始时(首次给药当天为第0天)及测量计数时的肿瘤体积。CRTV、TRTV分别为实验结束时的空白对照组及实验组的相对肿瘤体积。结果见表17和图4、图5。

[0739] 表17 ADC抑瘤实验结果

[0740]

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	-

[0741]

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%**

[0742] vs空白:**p<0.01。

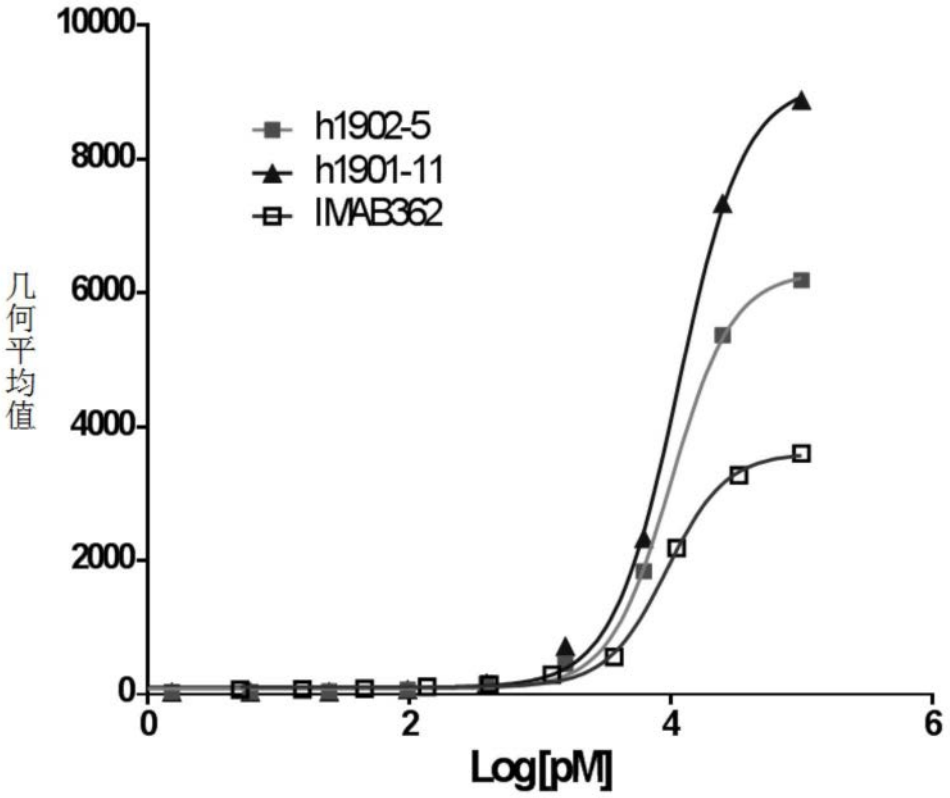

10000
8000
6000
4000
2000
0
几何平均值
h1902-5
h1901-11
IMAB362
0
2
4
6
Log[pM]

图1

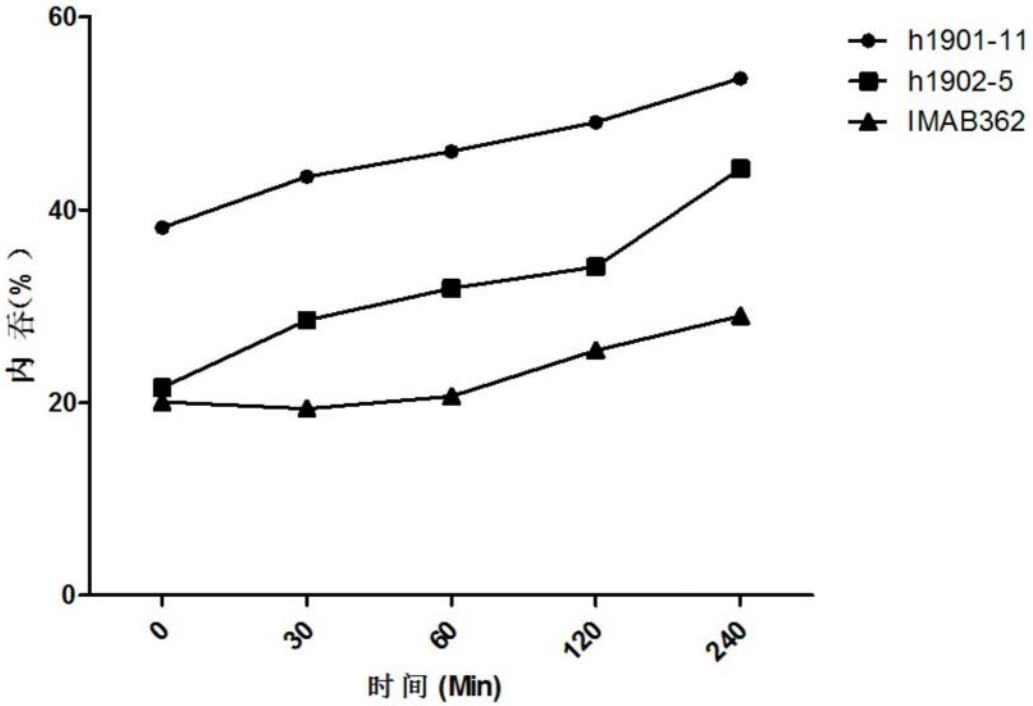

60
40
20
0
内吞(%)
h1901-11
h1902-5
IMAB362
0
30
60
120
240
时间 (Min)

图2

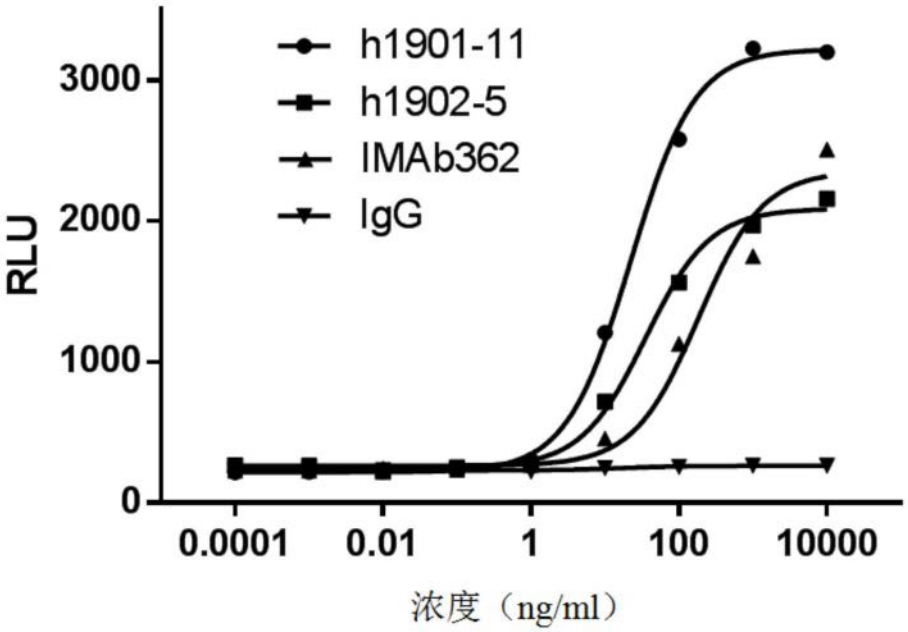

h1901-11
h1902-5
IMAb362
IgG
RLU
3000
2000
1000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（ng/ml）

图3A

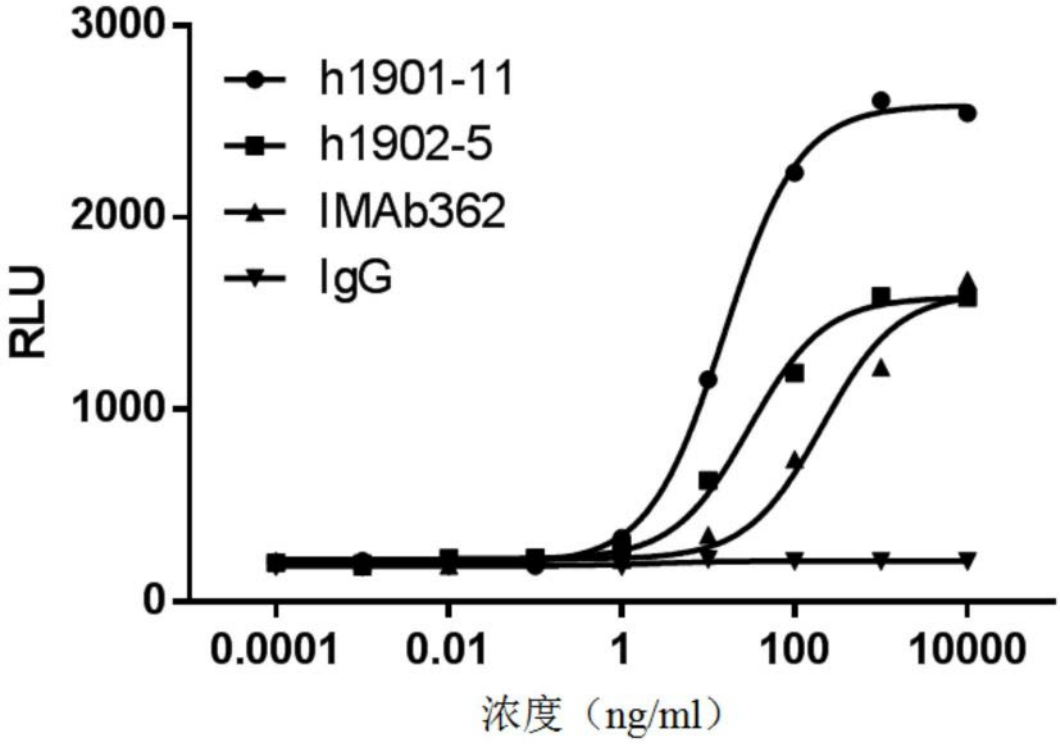

h1901-11
h1902-5
IMAb362
IgG
RLU
3000
2000
1000
0
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（ng/ml）

图3B

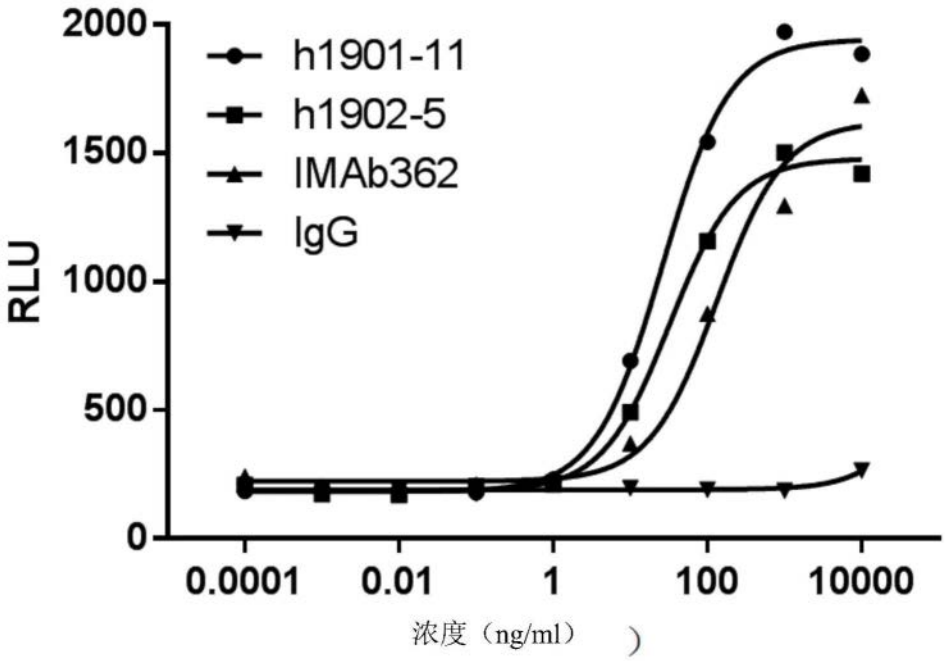

2000
1500
1000
500
0
RLU
h1901-11
h1902-5
IMAb362
IgG
0.0001
0.01
1
100
10000
浓度（ng/ml）

图3C

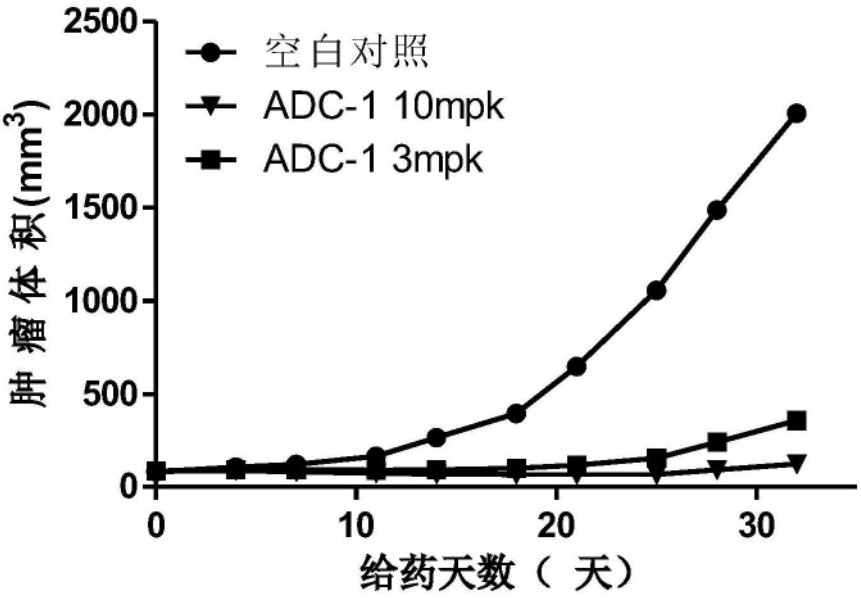

2500
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积(mm3)
空白对照
ADC-1 10mpk
ADC-1 3mpk
0
10
20
30
给药天数（ 天）

图4

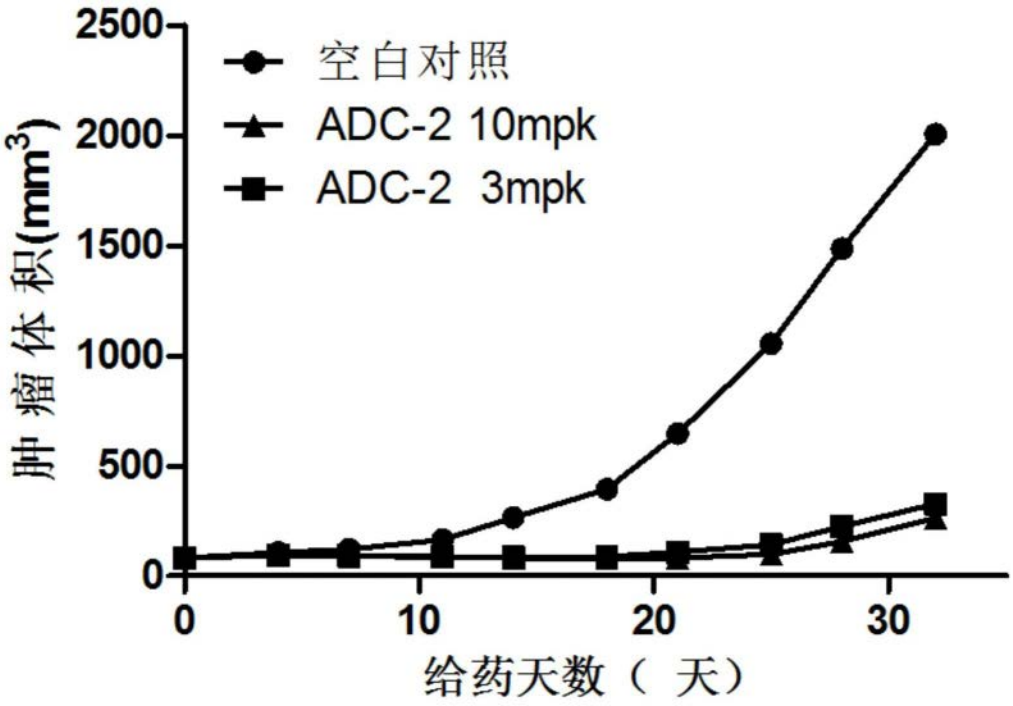

2500
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积(mm3)
空白对照
ADC-2 10mpk
ADC-2 3mpk
0
10
20
30
给药天数（ 天）

图5