



(21) 申請案號：109116820

(22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 05 月 21 日

(51) Int. Cl. :

*C07K16/28 (2006.01)**C07K19/00 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)**C12N1/19 (2006.01)**C12N1/21 (2006.01)**C12N15/13 (2006.01)**C12N15/70 (2006.01)**C12N15/81 (2006.01)**C12N15/85 (2006.01)**C12N5/10 (2006.01)*

(30) 優先權：2019/05/24 中國大陸

201910437800.2

2019/05/24 中國大陸

201910437806.X

(71) 申請人：大陸商三優生物醫藥（上海）有限公司（中國大陸） (CN)

中國大陸

(72) 發明人：譚永聰 (CN)；郎國竣 (CN)；孔超 (CN)；劉嬋娟 (CN)；鄧敏 (CN)；吳琪

(CN)；張靜 (CN)；張文海 (CN)；範寶國 (CN)

(74) 代理人：蔡清福；蔡馭理

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：31 項 圖式數：15 共 147 頁

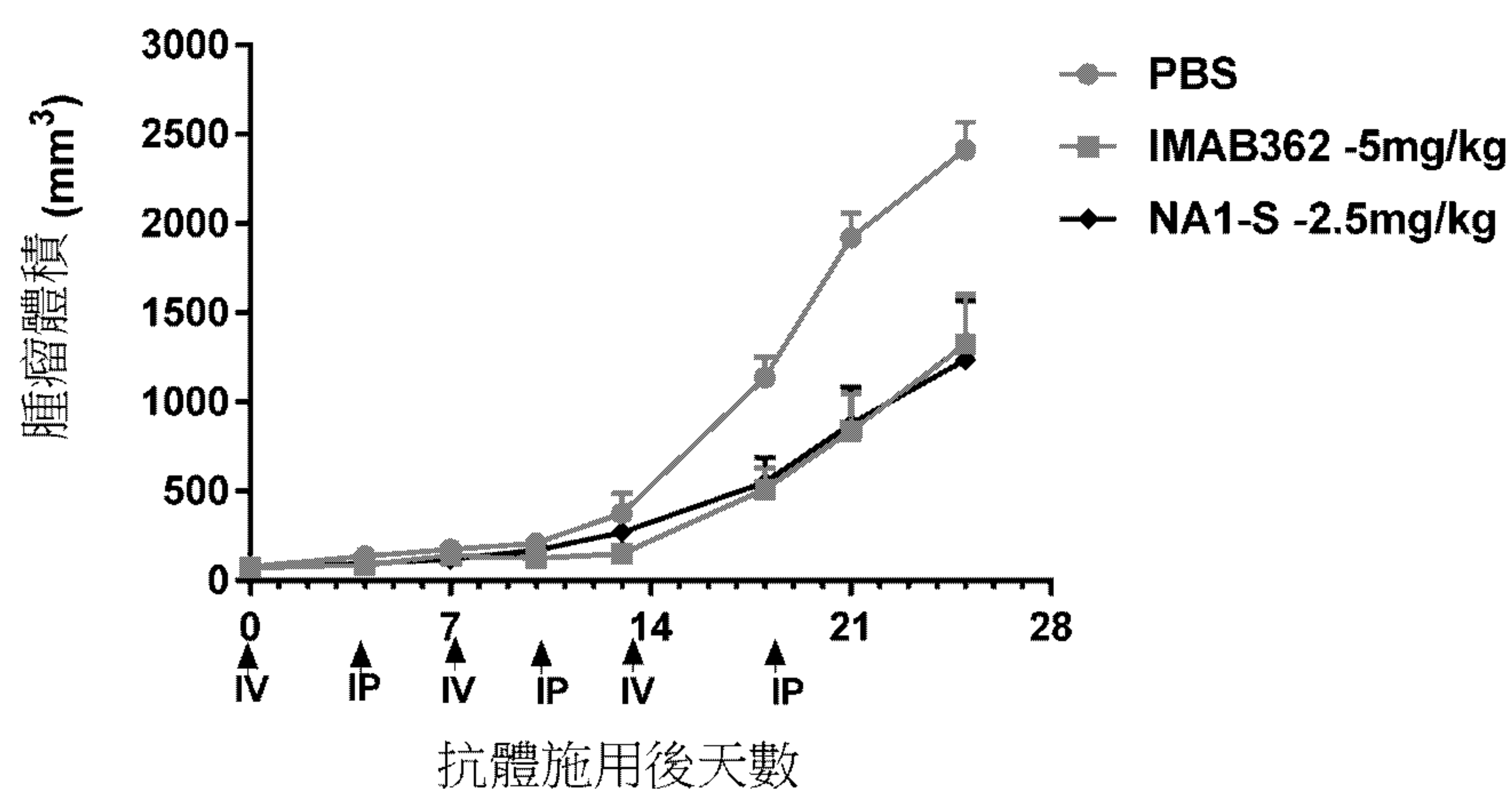
(54) 名稱

新型 CLDN18.2 結合分子

(57) 摘要

本發明提供了新型 CLDN18.2 結合分子。本發明還提供了編碼該 CLDN18.2 結合分子的核酸分子，用於表達 CLDN18.2 結合分子的表達載體和宿主細胞。本發明進一步提供了產生該 CLDN18.2 結合分子的方法及其用途。

指定代表圖：



符號簡單說明：

NA1-S: 候選抗體

PBS: 磷酸鹽緩衝鹽水

圖 9a



202108627

【發明摘要】

【中文發明名稱】 新型CLDN18.2結合分子

【中文】本發明提供了新型CLDN18.2結合分子。本發明還提供了編碼該CLDN18.2結合分子的核酸分子，用於表達CLDN18.2結合分子的表達載體和宿主細胞。本發明進一步提供了產生該CLDN18.2結合分子的方法及其用途。

【指定代表圖】 圖9a

【代表圖之符號簡單說明】

NA1-S：候選抗體

PBS：磷酸鹽緩衝鹽水

【發明說明書】

【中文發明名稱】 新型CLDN18.2結合分子

【技術領域】

優先權資訊

【0001】本申請要求2019年5月24日提交的中國專利申請201910437800.2和201910437806.X的優先權，其全部內容藉由提述併入本文。

序列表

【0002】本申請包含序列表，並且其全部內容藉由引用併入本文。

【0003】本申請一般而言涉及抗體。更具體地，本申請涉及特異性識別CLDN18.2的單結構域抗體、其製備方法及其用途。

【先前技術】

【0004】細胞連接是細胞間的聯繫結構，是多細胞有機體中相鄰細胞之間相互聯繫、協同作用的重要基礎。一般而言，動物細胞有四種類型的連接：緊密連接、黏著連接、間隙連接和橋粒/半橋粒。

【0005】緊密連接，也稱為封閉連接，是在內皮細胞或者上皮細胞間形成的結構，可以防止組織間的物質從細胞間隙中擴散，從而只能藉由主動運輸進入細胞。緊密連接的結構由幾十種Claudin蛋白藉由細胞內和細胞間的蛋白質相互作用形成，而這些蛋白質的表達具有一定的組織特異性。CLDN18就是緊密連接中存在的Claudin蛋白中的一種重要的蛋白質。

【0006】CLDN18是具有四次跨膜區域的膜蛋白，含有兩個胞外結構域。人體內存在兩種CLDN18變體，分別是CLDN18.1和CLDN18.2。兩者分佈於不同的組織，前者主要表達在肺上皮細胞中，後者則特異性表達在胃上皮細胞中，且在胃幹細胞中不表達。在蛋白序列上，CLDN18.1和CLDN18.2的序列相似度極高，兩者的主要差別在N端，在第一個胞外結構域兩者僅存在8個氨基酸的差別；除了N端之外，C端序列完全一致。

【0007】抗體療法正在成為治療癌症患者的最有前途的方法之一。CLDN18.2由於其在腫瘤細胞和正常組織中的表達特異性，目前已經成為非常有潛力的一個抗體藥物作用靶點。然而，由於CLDN18.1和CLDN18.2的序列相似性極高，使得開發只針對CLDN18.2而不針對CLDN18.1的抗體極其困難，世界範圍內鮮有報導。截止目前，德國Ganymed公司研製的IMAB362是唯一針對CLDN18.2靶點的臨床在研抗體。IMAB362是一種由兩條蛋白重鏈和兩條蛋白輕鏈組成的單殖株抗體。目前，尚不存在靶向CLDN18.2的單結構域抗體。

【0008】單結構域抗體簡稱單域抗體(single domain antibody, sdAb)，是由單個單體可變抗體結構域（如抗體重鏈可變結構域）組成的抗體。像整個抗體（如IgG）一樣，它能夠選擇性結合特定的抗原。但單結構域抗體分子量卻遠小於由兩條蛋白重鏈和兩條蛋白輕鏈組成的常見抗體。第一個單結構域抗體是由駱駝科動物中發現的重鏈抗體改造而來的(Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 363(6428):446–448.)；這些駱駝科動物中發現的

重鏈抗體也被稱為VHH片段。目前，對單結構域抗體的大多數研究基於重鏈可變結構域。

【0009】單結構域抗體具有許多優點。例如，它們通常表現出較高的溶解度、良好的熱穩定性和組織滲透性，單結構域抗體由於存在第二對分子內二硫鍵還可耐受木瓜蛋白酶等的降解；此外，單結構域抗體可以在酵母、植物和哺乳動物細胞等多種宿主細胞中表達，且表達量較高，使得其具有極高的成本優勢。單結構域抗體的優勢使其適用於各種生物技術和治療應用。例如，它們可用於治療疾病，包括但不限於癌症、感染性疾病、炎症性疾病和神經退行性疾病。

【0010】雖然目前已經有靶向CLDN18.2靶點的臨床在研單殖株抗體藥物，但作為治療劑，仍有繼續開發靶向CLDN18.2靶點抗體的迫切需要。本領域希望開發新的靶向CLDN18.2的抗體，特別是只特異性識別CLDN18.2而不識別CLDN18.1的單結構域抗體。

【發明內容】

【0011】廣義而言，本揭露提供抗體的新型化合物、製備方法、組合物和製品。本揭露提供的益處廣泛地適用於抗體治療和診斷領域。更具體而言，本揭露提供了靶向CLDN18.2的單結構域抗體，以及製備該抗體的方法、用於表達該抗體的表達載體和宿主細胞等。本揭露的抗體提供了治療或預防與Claudin蛋白相關、特別是與CLDN18.2相關的病症的方法及其應用。

【0012】本發明人首次發現，能夠特異性結合人CLDN18.2的胞外結構域1（ECD1）的CLDN18.2結合分子（如靶向CLDN18.2的單結構域抗體）。

【0013】本揭露至少包括以下實施方案，其分別以“N”（其中“N”表示數位）的方式進行排序和列舉。以下列舉非窮盡性的，並且本領域技術人員可對不同的技術方案進行組合。

【0014】1. CLDN18.2結合分子，其包含至少一個免疫球蛋白單可變結構域，其中該免疫球蛋白單可變結構域包含選自以下任一組的CDR1、CDR2和CDR3：

(a) CDR1包含與SEQ ID NO：1至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列，CDR2包含與SEQ ID NO：2至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列，和CDR3包含與SEQ ID NO：3至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列；和

(b) CDR1包含與SEQ ID NO：30至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列，CDR2包含與SEQ ID NO：31至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列，和CDR3包含與SEQ ID NO：32至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列。

【0015】2.實施方案1的CLDN18.2結合分子，其中：

(a) CDR1在氨基酸序列上與SEQ ID NO：1存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，CDR2在氨基酸序列上與SEQ ID NO：2存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，和/或CDR3在氨基酸序列上與SEQ ID NO：3存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異；或

(b) CDR1在氨基酸序列上與SEQ ID NO：30存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，CDR2在氨基酸序列上與SEQ ID NO：31存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，和/或CDR3在氨基酸序

列上與SEQ ID NO：32存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異。

【0016】 3.實施方案1的CLDN18.2結合分子，其中：

(a) CDR1在氨基酸序列上與SEQ ID NO：1存在1個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，CDR2在氨基酸序列上與SEQ ID NO：2存在1個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，和/或CDR3在氨基酸序列上與SEQ ID NO：3存在1個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異；或

(b) CDR1在氨基酸序列上與SEQ ID NO：30存在1個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，CDR2在氨基酸序列上與SEQ ID NO：31存在1個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，和/或CDR3在氨基酸序列上與SEQ ID NO：32存在1個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異。

【0017】 4.前述實施方案中任一項的CLDN18.2結合分子，其中該CLDN18.2結合分子是針對CLDN18.2的抗體或其抗原結合片段。

【0018】 5.前述實施方案中任一項的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域是VHH；例如，來自駱駝科動物（例如羊駝）的VHH。

【0019】 6. 前述實施方案中任一項的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域包含選自以下任一組的CDR1、CDR2和CDR3：

(a) 如SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，如式ISRGGX₁T所示的氨基酸序列的CDR2，其中X₁為T或S，和如式NAQAWDX₂GTX₃RYLEV所示的氨基酸序列的CDR3，其中X₂為P或V，X₃為F或I；和

(b) 如SEQ ID NO：30、33、34、35、36、38、39或40所示的氨基酸序列的CDR1，如式X₄STGGTT所示的氨基酸序列的CDR2，其中X₄為I或M，和如式NVLVX₅SGIGSX₆LEV所示的氨基酸序列的CDR3，其中X₅為I或V，X₆為H或T。

【0020】7. 前述實施方案中任一項的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域包含：

(a)如SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：2所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：3所示的氨基酸序列的CDR3；

(b)如SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：4所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：5所示的氨基酸序列的CDR3；或

(c)如SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：2所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：6所示的氨基酸序列的CDR3；

(d)如SEQ ID NO：30所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：32所示的氨基酸序列的CDR3；

(e)如SEQ ID NO：30所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；

(f)如SEQ ID NO：33所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；

(g)如SEQ ID NO：33所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；

(h)如SEQ ID NO：34所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；

(i)如SEQ ID NO：35所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；

(j)如SEQ ID NO：36所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；

(k)如SEQ ID NO：38所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；

(l)如SEQ ID NO：39所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：41所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；或
(m)如SEQ ID NO：40所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3。

【0021】 8. 前述實施方案中任一項的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域包含選自下組的任一種：

(a)SEQ ID NO：7的氨基酸序列，與SEQ ID NO：7至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列，或與SEQ ID NO：7相比具有一個或多個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列；

(b) SEQ ID NO：47所示的氨基酸序列，與SEQ ID NO：47至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列，或與SEQ ID NO：47相比具有一個或多個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

【0022】 9. 前述實施方案中任一項的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域為：

(a)在SEQ ID NO: 7的以下位點中的一個或多個發生修飾（例如，氨基酸的取代）：第1、4、5、14、16、35、47、56、58、65、92、102、105或121位氨基酸；或

(b) 在SEQ ID NO: 47的以下位點中的一個或多個發生修飾（例如，氨基酸的取代和/或添加）：第1、4、5、11、27、28、29、30、31、32、35、51、75、76、92、100、106或120位氨基酸。

【0023】 10. 前述實施方案中任一項的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域包含以下序列或由以下序列組成：SEQ ID NO: 7-14、SEQ ID NO: 42-51和63中的任一者。

【0024】 11. 前述實施方案中任一項的CLDN18.2結合分子，其中該CLDN18.2結合分子是單結構域抗體，例如重鏈單結構域抗體；嵌合抗體；或人源化抗體。

【0025】 12. 前述實施方案中任一項的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域與另一分子融合，該另一分子是例如免疫球蛋白(例如IgG)的Fc結構域或螢光蛋白。

【0026】 13. 實施方案12的CLDN18.2結合分子，其中該CLDN18.2結合分子是包含來自駱駝科動物的VHH與人IgG（例如，人IgG1或IgG4）的Fc結構域的嵌合抗體。

【0027】 14. 實施方案13的CLDN18.2結合分子，其中該CLDN18.2結合分子是包含來自羊駝的VHH與人IgG1的Fc結構域的嵌合抗體。

【0028】 15. 前述實施方案中任一項的CLDN18.2結合分子，其中該CLDN18.2結合分子結合人CLDN18.2的胞外結構域1（ECD1）。

【0029】 16. CLDN18.2結合分子，其與前述實施方案中任一項的CLDN18.2結合分子競爭相同表位。

【0030】 17. 前述實施方案中任一項的CLDN18.2結合分子，其特異性結合CLDN18.2，但不結合CLDN18.1。

【0031】 18. 分離的核酸分子，其包含編碼如前述實施方案中任一項所定義的CLDN18.2結合分子的核酸序列。

【0032】 19. 實施方案18的分離的核酸分子，其包含以下序列或由以下序列組成：SEQ ID NO: 22-29、SEQ ID NO: 52-61和64中的任一者。

【0033】 20. 一種表達載體，其包含實施方案18或19的分離的核酸分子。

【0034】 21. 一種宿主細胞，其包含實施方案20的表達載體。

【0035】 22. 實施方案21的宿主細胞，該宿主細胞是細菌細胞(例如大腸桿菌 (*E. coli*))，真菌細胞(例如酵母)或哺乳動物細胞。

【0036】 23. 一種藥物組合物，其包含至少一種如實施方案1-17中任一項所定義的CLDN18.2結合分子和藥學上可接受的載體。

【0037】 24. 製備如實施方案1-17中任一項所定義的CLDN18.2結合分子的方法，包括以下步驟：

- 在實施方案21或22的宿主細胞中表達實施方案1-17中任一項所定義的CLDN18.2結合分子；和

- 從宿主細胞分離CLDN18.2結合分子。

【0038】 25. 治療受試者中與CLDN18.2相關的病症的方法，該方法包括：向該受試者施用治療有效量的實施方案1-17中任一項所定義的CLDN18.2結合分子。

【0039】 26. 實施方案25所述的方法，其中該與CLDN18.2相關的病症包括涉及表達CLDN18.2的細胞的疾病或與表達CLDN18.2的細胞相關的疾病。

【0040】 27. 實施方案25或26所述的方法，其中該與CLDN18.2相關的病症包括癌症。

【0041】 28. 實施方案27所述的方法，其中該癌症包括骨癌、血癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳腺癌、前列腺癌、子宮癌、性器官和生殖器官癌、霍奇金氏病、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌症、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、膀胱癌、腎癌、腎細胞癌、腎盂癌、

中樞神經系統(CNS)腫瘤、神經外胚層癌症、脊柱軸腫瘤、膠質瘤、腦脊膜瘤和垂體腺瘤。

【0042】 29. 實施方案28所述的方法，其中該癌症為胃癌。

【0043】 30. 如實施方案1-17中任一項所定義的CLDN18.2結合分子在製備用於治療或預防與CLDN18.2相關的病症的藥物中的用途。

【0044】 31. 用於治療或診斷與CLDN18.2相關的病症的試劑盒，其包含容器，該容器包含實施方案1-17中任一項所定義的CLDN18.2結合分子。

【0045】 以上內容是概括性的描述，必要時可包含細節的簡化、概括和省略。因此，本領域技術人員將認識到，該概括性的描述僅是舉例說明性的，並不意圖以任何方式進行限制。本文所述的方法、組合物和/或裝置和/或其他主題的其它方面、特徵和優勢將在本文所示的教導中變得明顯。提供概括性的描述以簡化地介紹一些選擇的概念，這些概括性的描述將在下面的詳細描述中進一步描述。以上概括性的描述不旨在確定所要求保護的主題的關鍵特徵或基本特徵，也不旨在用作確定所要求保護的主題的範圍的輔助手段。此外，貫穿本申請引用的所有參考文獻、專利和揭露的專利申請的內容藉由引用整體併入本文。

【圖式簡單說明】

【0046】 圖1a和圖1b顯示實施例1中過表達細胞株和腫瘤細胞株的流式細胞術鑒定結果。其中，圖1a顯示人CLDN18.2-HEK293T、人CLDN18.1-HEK293、鼠CLDN18.2-HEK293和鼠CLDN18.1-HEK293過表達細胞株的流式細胞術鑒定結果；圖1b顯示人CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株的流式細胞術鑒定結果。

圖2a和圖2b顯示多個候選抗體之間的序列比較。其中，顯示了候選抗體的可變區全長序列以及其中的CDR序列，並標示了候選抗體之間的氨基酸序列差異。

圖 3a 顯示候選抗體 NA1-S 在人 CLDN18.2-HEK293T、人 CLDN18.1-HEK293、鼠CLDN18.2-HEK293和鼠CLDN18.1-HEK293過表達細胞株上的交叉結合實驗結果。圖3b顯示候選抗體NA3-S、NA5-S和NA6-S在人CLDN18.2-HEK293T、人CLDN18.1-HEK293、鼠CLDN18.2-HEK293和鼠CLDN18.1-HEK293過表達細胞株上的交叉結合實驗結果。

圖4a和圖4b顯示候選抗體NA1-S和對照抗體在細胞水準上的結合比較實驗結果。其中，圖4a顯示抗體NA1-S在人CLDN18.2-HEK293T過表達細胞上的流式水準比較實驗結果；圖 4b 顯示抗體 NA1-S 和對照抗體在人 CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株上的流式水準比較實驗結果。

圖5a至圖5c顯示候選抗體NA3-S、NA5-S、NA6-S和對照抗體在細胞水準上的結合比較實驗結果。其中，圖 5a 顯示抗體 NA3-S、NA6-S 在人 CLDN18.2-HEK293T過表達細胞上的流式水準比較實驗結果；圖5b顯示抗體NA5-S在人CLDN18.2-HEK293T過表達細胞上的流式水準比較實驗結果；圖 5c 顯示抗體 NA3-S、NA5-S、NA6-S 和對照抗體 在人 CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株上的流式水準比較實驗結果。

圖6a和圖6b顯示候選抗體NA1-S在人CLDN18.2-HEK293T過表達細胞株以及人CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株上介導的補體依賴的細胞毒性作用（CDC）。其中，圖6a顯示抗體NA1-S在人CLDN18.2-HEK293T上介導的CDC；圖6b顯示抗體NA1-S在人CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株上介導的CDC。

圖7a至圖7d顯示候選抗體NA3-S、NA5-S和NA6-S在人CLDN18.2-HEK293T過表達細胞株以及人CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株上介導的補體依賴的細胞毒性作用(CDC)。其中，圖7a顯示抗體NA3-S在人CLDN18.2-HEK293T上介導的CDC細胞毒性效應；圖7b和圖7c分別顯示NA5-S和NA6-S在人CLDN18.2-HEK293T細胞上的CDC殺傷效應；圖7d顯示抗體NA3-S在人CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株上介導的CDC。

圖8a至圖8d顯示候選抗體NA1-S和NA3-S在人CLDN18.2-HEK293T以及人CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株上介導的抗體依賴的細胞介導的細胞毒性作用(ADCC)。其中，圖8a和圖8c顯示抗體NA1-S和NA3-S在人CLDN18.2-HEK293T細胞株上介導的ADCC；圖8b和圖8d顯示抗體NA1-S和NA3-S在人CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株上介導的ADCC。

圖9a和圖9b顯示了候選抗體NA1-S和NA3-S在人CLDN18.2-HEK293T異種移植模型中的腫瘤抑制效果。其中，小鼠採用的是免疫缺陷小鼠SCID，而NA1-S和IMAB362的給藥劑量根據品質濃度計算給藥，給藥方式採用的是尾靜脈和腹腔交叉給藥。

圖10a至圖10i顯示候選抗體NA1-S、NA3-S和IMAB362結合CLDN18.2的表位以及結合的關鍵氨基酸位點。其中，圖10a至圖10b顯示了候選抗體NA1-S(圖10a)或NA3-S(圖10b)與IMAB362在人CLDN18.2-HEK293T上與IMAB362的競爭結合試驗；圖10c至圖10d顯示了抗體IMAB362在人CLDN18.2-HEK293T上與NA1-S(圖10c)或NA3-S(圖10d)的競爭結合試驗。圖10e採用抗CLDN18抗體測定人CLDN18.2突變體細胞株上的突變或者野生CLDN18.2的表達水準；圖10f至圖10g顯示了NA1-S(圖10f)或NA3-S(圖10g)和IMAB362在人CLDN18.2突變體細胞株上與CLDN18.2突變體的

結合水準；圖10h至圖10i顯示了NA1-S(圖10h)或NA3-S(圖10i)和IMAB362在人CLDN18.2突變體細胞株上相對於野生細胞株的相對結合百分比。

圖11a至圖11b顯示了NA1-S(圖11a)或NA3-S(圖11b)和IMAB362在Fab-ZAP存在下對CLDN18.2-HEK293T的細胞殺傷效率，其中試驗以hIgG和Fab-ZAP作為對照，而Fab-ZAP與細胞長時間孵育也對細胞具有一定的毒性作用。

圖12顯示了NA3-S在序列經過人源化修飾前後在CLDN18.2-HEK293T細胞的結合活性，其中NA3S-H1為人源化後分子。

圖13比較了高濃度下NA3S-H1和IMAB362在CLDN18.1-HEK293T細胞上的抗體結合強度和抗體結合陽性率。其中，圖13a顯示了不同濃度的NA3S-H1和IMAB362在CLDN18.1-HEK293T細胞上的結合強度，而圖13b顯示了高濃度下(100 µg/ml)，NA3S-H1和IMAB362在CLDN18.1-HEK293T細胞上的結合陽性率，試驗都以同種型抗體作為對照。

圖14顯示了人源化分子NA3S-H1在人CLDN18.2-KATOIII胃癌細胞上的CDC細胞殺傷效率，其中對照抗體為IMAB362。

圖15顯示了NA3S-H1和IMAB362介導NK細胞在不同靶細胞上的ADCC細胞殺傷效應。其中，圖15a顯示了以人CLDN18.2-KATOIII為靶細胞，NA3S-H1和IMAB362介導的ADCC細胞殺傷效應；圖15b顯示了以人CLDN18.2-HEK293T為靶細胞，NA3S-H1和IMAB362介導的ADCC細胞殺傷效應。

【實施方式】

【0047】雖然本發明可以以許多不同的形式來實施，但在此揭露的是驗證本發明原理的其具體的舉例說明性實施方案。應該強調的是，本發明不限

於所舉例說明的具體實施方案。此外，本文使用的任何章節標題僅用於組織目的，並不被解釋為限制所描述的主題。

【0048】 除非在此另外定義，否則與本發明結合使用的科學和技術術語將具有本領域普通技術人員通常理解的含義。此外，除非上下文另有要求，單數形式的術語應包括複數形式，複數形式的術語應包括單數形式。更具體地，如在本說明書和所附申請專利範圍中所使用的，除非上下文另外明確指出，否則單數形式“一”、“一個”和“該”包括複數指示物。因此，例如，提及“一種蛋白質”包括多種蛋白質；提及“一個細胞”包括細胞的混合物等。在本申請中，除非另有說明，否則使用“或”意指“和/或”。此外，術語“包含”以及其他形式(諸如“包括”和“含有”)的使用不是限制性的。此外，說明書和所附申請專利範圍中提供的範圍包括端點和端點之間的所有值。

【0049】 通常，與本文描述的細胞和組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學和蛋白質以及核酸化學和雜交有關的術語以及其技術是本領域眾所週知和常用的術語。除非另有說明，否則本發明的方法和技術通常根據本領域公知的常規方法進行，並如在本說明書全文中引用和討論的各種通用和更具體的參考文獻中該進行。參見例如Abbas等人，*Cellular and Molecular Immunology*，6th ed.，W.B. Saunders Company (2010); Sambrook J. & Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，3rd ed.，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，N.Y. (2000); Ausubel等人，*Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*，Wiley，John & Sons，Inc. (2002); Harlow and

Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); 和Coligan等人, *Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons, Inc. (2003)。與本文描述的分析化學，合成有機化學和藥物化學有關的術語以及實驗室程式和技術是本領域中眾所週知和常用的術語。此外，本文使用的任何章節標題僅用於組織目的，並且不被解釋為限制所描述的主題。

定義

【0050】為了更好地理解本發明，相關術語的定義和解釋提供如下。

【0051】如本文所用，術語“抗體”或“Ab”通常是指表現出所需生物學或結合活性的任何形式的抗體。它包括但不限於人源化抗體、完全人抗體、嵌合抗體和單結構域抗體。抗體可以包含重鏈和輕鏈。重鏈可分為 μ 、 δ 、 γ 、 α 和 ϵ ，它們分別將抗體的同種型定義為IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每條重鏈由重鏈可變區(VH)和重鏈恆定區(CH)組成。重鏈恆定區由3個結構域(CH1，CH2和CH3)組成。每條輕鏈由輕鏈可變區(VL)和輕鏈恆定區(CL)組成。VH和VL區可以進一步分為相對保守的區域(稱為框架區(FR))和由FR間隔開的高變區(稱為互補決定區(CDR))。每個VH和VL由以下順序的3個CDR和4個FR組成：從N端到C端的FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。氨基酸在各種區域或結構域中的分佈遵循Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))或Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia等人, (1989) Nature 342:878-883中的定義。抗體可以具有不同的抗體同種型，例如IgG(包括例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亞型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM抗體。

【0052】如本文所用的術語“人源化抗體”是指其中來源於另一種哺乳動物物種如小鼠的種系的CDR序列已被移植到人框架序列上的抗體。可以在人框架序列內進行額外的框架區修飾。

【0053】如本文所用的術語“嵌合抗體”廣義上是指含有來自一種抗體的一個或多個區和來自一種或多種其他抗體的一個或多個區的工程化抗體。具體而言，嵌合抗體包含衍生自非人動物抗體的可變區和另一抗體的恆定區，例如包含小鼠來源的可變區和人來源的恆定區。嵌合抗體還可指對至少兩種不同抗原具有特異性的多特異性抗體。

【0054】如本文所用的術語“CLDN18.2結合分子”意指特異性結合CLDN18.2的分子。

【0055】如本文所用的術語“CLDN18.2抗體”、“針對CLDN18.2的抗體”、“特異性結合CLDN18.2的抗體”、“特異性靶向CLDN18.2的抗體”、“特異性識別CLDN18.2的抗體”可互換地使用，意指能夠與Claudin蛋白CLDN18.2特異性結合的抗體。特別地，在具體實施方案中，意指與人CLDN18.2特異性結合的抗體，特別是與人CLDN18.2特異性結合而不與人CLDN18.1特異性結合的抗體。人CLDN18.2和人CLDN18.1的氨基酸序列分別如SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 16所示；小鼠CLDN18.2和小鼠CLDN18.1的氨基酸序列分別如SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18所示。

【0056】如本文所用的術語“免疫球蛋白單可變結構域”或“ISV”在本文中通常定義為這樣的氨基酸序列：其包含免疫球蛋白折疊或在適合的條件下(如生理條件下)能夠形成免疫球蛋白折疊(即藉由折疊)，即從而形成免疫球蛋白可變結構域(例如，VH、VL或VHH結構域)；和形成(或在適合的條件下能夠形成)免疫球蛋白可變結構域，其包含功能性抗原結合位點(在其不

需要與另一個免疫球蛋白可變結構域相互作用(如VH-VL相互作用)以形成功能性抗原結合位點的意義上)。

【0057】如本文所用的術語“ K_a ”旨在表示特定抗體-抗原相互作用的締合速率，而本文所用的術語“ K_d ”旨在表示特定抗體-抗原相互作用的解離速率。如本文所用，術語“ K_D ”或“ K_D 值”旨在表示特定抗體-抗原相互作用的解離常數，其從 K_d 與 K_a 的比率(即， K_d/K_a)獲得並且表示為摩爾濃度(M)。抗體的 K_D 值可以使用本領域良好建立的方法來確定。確定抗體 K_D 值的較佳方法是藉由使用表面電漿共振，較佳使用生物感測器系統如Biacore®系統。

【0058】如本文所用的術語“特異性結合”或“特異性結合至”是指兩個分子之間例如抗體和抗原之間的非隨機結合反應。

【0059】如本文所用，“抑制結合”、“阻斷結合”或“競爭相同表位”的能力是指抗體抑制兩個分子的結合至任何可檢測的程度的能力。在一些實施方案中，阻斷兩個分子之間結合的抗體將兩個分子之間的結合相互作用抑制至少50%。在一些實施方案中，該抑制可以大於60%、大於70%、大於80%或大於90%。

【0060】如本文所用的術語“高親和力”的抗體是指標對靶抗原具有 1×10^{-7} M或更低、更佳 5×10^{-8} M或更低、甚至更佳 1×10^{-8} M或更低、甚至更佳 5×10^{-9} M或更低、和甚至更佳 1×10^{-9} M或更低的 K_D 值的抗體。

【0061】如本文所用的術語“ EC_{50} ”，也被稱為“半數有效濃度”，是指在特定的暴露時間後誘導在基線和最大值之間的50%的應答的藥物、抗體或毒劑的濃度。在本申請的上下文中， EC_{50} 的單位為“nM”。如本文所用，術語“表位”是指免疫球蛋白或抗體特異性結合的抗原部分。“表位”也被稱為“抗原決定簇”。表位或抗原決定簇通常由分子例如氨基酸、碳水

化合物或糖側鏈的化學活性表面基團組成，並且通常具有特定的三維結構和特定的電荷特徵。例如，表位通常包含獨特立體構象中的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個連續或不連續的氨基酸，其可以是“線性表位元”或“構象表位”。參見例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)。在線性表位元中，蛋白質和相互作用分子(例如抗體)之間的所有相互作用位點沿蛋白質的一級氨基酸序列線性存在。在構象表位中，相互作用位點跨越蛋白質中彼此分離的氨基酸殘基。取決於藉由本領域技術人員已知的常規技術檢測的結合相同表位的競爭性，可以篩選抗體。例如，可以進行競爭或交叉競爭研究以獲得彼此競爭或交叉競爭結合抗原(例如CLDN18.2)的抗體。在國際專利申請WO 03/048731中描述了用於獲得結合相同表位的抗體的高通量方法，其基於它們的交叉競爭。

【0062】如本文所用，術語“分離的”是指藉由人工方式從天然狀態獲得的物質或組分的狀態。如果某種“分離的”物質或組分天然存在，則可能是因為其所處的天然環境發生了變化，或者從天然環境下分離出該物質或組分，或者兩者兼而有之。例如，某種未分離的多核苷酸或多肽天然存在於某個活體動物體內，從該天然狀態分離的相同的高純度多核苷酸或多肽被稱為分離的多核苷酸或多肽。術語“分離的”既不排除混合的人造或合成物質，也不排除不影響分離的物質的活性的其他不純物質。

【0063】如本文所用，術語“分離的抗體”旨在指基本上不含具有不同抗原特異性的其他抗體的抗體。此外，分離的抗體可以基本上不含其他細胞材料和/或化學物質。

【0064】如本文所用，術語“載體”是指可以在其中插入多核苷酸的核酸媒介物。當載體允許插入其中的多核苷酸編碼的蛋白質的表達時，該載體

稱為表達載體。該載體可以藉由轉化、轉導或轉染入宿主細胞而使攜帶的遺傳物質元件在宿主細胞中表達。載體是本領域技術人員所熟知的，包括但不限於質粒，噬菌體，黏粒，人工染色體如酵母人工染色體(YAC)、細菌人工染色體(BAC)或P1衍生人工染色體(PAC)，噬菌體如 λ 噬菌體或M13噬菌體和動物病毒。可用作載體的動物病毒包括但不限於逆轉錄病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺伴隨病毒、疱疹病毒(如單純疱疹病毒)、痘病毒、桿狀病毒、乳頭瘤病毒、乳多空病毒(如SV40)。載體可以包含用於控制表達的多個元件，包括但不限於啟動子序列、轉錄起始序列、增強子序列、選擇元件和報導基因。另外，載體可以包含複製起點。

【0065】如本文所用，術語“宿主細胞”是指可以導入載體的任何種類的細胞系統，包括但不限於原核細胞如大腸桿菌(*E. coli*)或枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)、真菌細胞如酵母細胞或麴黴屬(*Aspergillus*)、昆蟲細胞如S2果蠅細胞或Sf9，以及動物細胞如成纖維細胞、CHO細胞、COS細胞、NSO細胞、HeLa細胞、BHK細胞、HEK293細胞或人細胞。

【0066】利用宿主細胞生產本發明的抗體的方法是本領域常規的，包括在原核或真核細胞中表達抗體，然後分離抗體，並通常純化至可藥用的純度。如在一些實施方案中，藉由本領域已知的標準技術將編碼抗體的核酸插入到表達載體並將表達載體導入合適的原核或真核宿主細胞，在足以產生本發明的抗體或其功能性片段的條件和時間下培養宿主細胞，如CHO細胞、NSO細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、PER.C6 (R)細胞、酵母或大腸桿菌細胞，並從細胞(裂解後的上清液或細胞)中回收抗體及對抗體進行純化。用於生產抗體的常規方法是本領域現有技術已知的，描述在例如 Makrides, S.C., *Protein Expr.Purif.* 17 (1999) 183-202 ; Geisse, S.等人, *Protein*

Expr.Purif.8(1996) 271-282 ; Kaufman, R.J. , Mol.Biotechnol.16(2000) 151-160 ; Werner,R.G. , Drug Res.48 (1998) 870-880 的綜述文章中。

【0067】如本文所用，術語“同一性”是指藉由比對和比較序列確定的兩個或更多個多肽分子或兩個或更多個核酸分子的序列之間的關係。“百分比同一性”是指比較分子中氨基酸或核苷酸之間相同殘基的百分比，並基於被比較的最小分子的大小計算。對於這些計算，比對中的間隙(如果有的話)較佳藉由特定的數學模型或電腦程式(即“演算法”)來定址。可以用於計算比對的核酸或多肽的同一性的方法包括在Computational Molecular Biology , (Lesk , A. M. , ed.) , 1988 , New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects , (Smith , D. W. , ed.) , 1993 , New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data , Part I , (Griffin , A. M. , and Griffin , H. G. , eds.) , 1994 , New Jersey: Humana Press; von Heinje , G. , 1987 , Sequence Analysis in Molecular Biology , New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer , (Gribskov , M. and Devereux , J. , eds.) , 1991 , New York: M. Stockton Press; 和Carillo等人 , 1988 , SIAMJ. Applied Math. 48:1073中描述的那些。

【0068】如本文所用，術語“免疫原性”是指刺激生物體中特異性抗體或致敏淋巴細胞形成的能力。它不僅指抗原刺激特定免疫細胞活化、增殖和分化以最終產生免疫效應物質如抗體和致敏淋巴細胞的性質，還指抗體或致敏T淋巴細胞的特異性免疫應答可以在用抗原刺激生物體後在生物體的免疫系統中形成。免疫原性是抗原最重要的特性。抗原是否能夠成功誘導宿主中免疫應答的產生取決於三個因素：抗原的性質、宿主的反應性和免疫手段。

【0069】如本文所用，術語“轉染”是指將核酸引入真核細胞特別是哺乳動物細胞的過程。用於轉染的方案和技術包括但不限於脂質轉染、化學和物理方法轉染如電穿孔。許多轉染技術在本領域是公知的，參見例如Graham等人，1973，*Virology* 52:456; Sambrook等人，2001，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Davis等人，1986，*Basic Methods in Molecular Biology*，Elsevier; Chu et al，1981，*Gene* 13:197。

【0070】如本文所用，術語“螢光啟動細胞分選”或“FACS”是指專門類型的流式細胞術。它提供了根據每個細胞的特定光散射和螢光特徵，將生物細胞的異質混合物以每次一個細胞分揀到兩個或更多個容器中的方法(FlowMetric. “Sorting Out Fluorescence Activated Cell Sorting”. 2017-11-09)。用於進行FACS的儀器是本領域技術人員已知的並且對於公眾是可商購獲得的。這種儀器的實例包括Becton Dickinson(Foster City，CA)的FACS Star Plus、FACSscan和FACSsort儀器、來自Coulter Epics Division(Hialeah，FL)的Epics C和來自Cytomation(Colorado Springs，Colorado)的MoFlo。

【0071】術語“受試者”包括任何人或非人動物，較佳人。

【0072】如本文所用，術語“與CLDN18.2相關的病症”是指由CLDN18.2(如人CLDN18.2)的增加或減少的表達或活性引起、加重或以其它方式與其相關的任何病症。

【0073】如本文所用，術語“癌症”是指引發醫學病症的任何腫瘤或惡性細胞生長、增殖或轉移介導的實體瘤或非實體瘤如白血病。

【0074】本文在治療病情的情況中使用的術語“治療”一般涉及人或動物的治療和療法，其中實現了一些期望的治療效果，例如，抑制病情進展，包括進展速度下降、進展速度停滯、病情消退、病情改善和病情治癒。還包括了作為預防措施(即預防)的治療。對於癌症，“治療”可能是指抑制或

減緩腫瘤或惡性細胞生長、增殖或轉移或其某種組合。對於腫瘤，“治療”包括去除全部或部分腫瘤、抑制或減緩腫瘤生長和轉移、預防或延遲腫瘤的發展或其某種組合。

【0075】如本文所用，術語“治療有效量”涉及活性化合物或包含活性化合物的材料、組合物或劑型的量，其在按照所需的治療方案施用時有效用於產生與合理的益處/風險比相稱的某些所需的治療效果。具體而言，“治療有效量”意指抗體或其抗原結合部分有效治療與CLDN18.2相關的病症的量或濃度。

【0076】如本文所用，術語“藥學上可接受”是指載體、稀釋劑、賦形劑和/或其鹽在化學和/或物理上與製劑中的其他成分相容，並且與接受者在生理學上相容。

【0077】如本文所用，術語“藥學上可接受的載體和/或賦形劑”是指在藥理學和/或生理學上與受試者和活性劑相容的載體和/或賦形劑，其在本領域中是公知的(參見例如，Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995)，並且包括但不限於pH調節劑、表面活性劑、佐劑和離子強度增強劑。例如，pH調節劑包括但不限於磷酸鹽緩衝液；表面活性劑包括但不限於陽離子、陰離子或非離子表面活性劑，例如Tween-80；離子強度增強劑包括但不限於氯化鈉。

【0078】如本文所用，術語“佐劑”是指非特異性免疫增強劑，其在與抗原一起遞送至生物體或被提前遞送至生物體時可以增強生物體中的對抗原的免疫應答或改變免疫應答的類型。現有技術中存在多種佐劑，包括但不限於鋁佐劑(例如氫氧化鋁)、弗氏佐劑(例如弗氏完全佐劑和弗氏不完全佐

劑)、短小棒狀桿菌、脂多糖、細胞因數等。弗氏佐劑是目前動物實驗中最常用的佐劑。氫氧化鋁佐劑更常用於臨床試驗。

CLDN18.2結合分子

【0079】 在一些方面，本揭露包含CLDN18.2結合分子。

【0080】 一般來說，CLDN18.2結合分子可以包括任何特異性結合CLDN18.2的分子。在一些情況下，“CLDN18.2結合分子”可以包括“CLDN18.2拮抗劑”。CLDN18.2結合分子或CLDN18.2拮抗劑可以是多肽或蛋白質，例如抗體，更具體地說是特異性結合CLDN18.2（如人CLDN18.2）的抗體。

【0081】 抗體包括但不限於嵌合抗體、人源化抗體或單結構域抗體等。在具體的實施方案中，CLDN18.2結合分子是單結構域抗體，其通常是指由單個單體可變抗體結構域組成的抗體。像整個抗體一樣，單結構域抗體能夠選擇性結合特定抗原。

【0082】 更具體而言，CLDN18.2結合分子是重鏈單結構域抗體，其可與術語“VHH”、“VHH抗體”、“VHH結構域”、“VHH抗體片段”、“V_{HH}”或“奈米抗體”等互換使用。來自駱駝科抗體的VHH分子是已知的最小完整抗原結合結構域之一(約15KDa，或是常規IgG的1/10)，因此非常適合遞送至緻密組織和進入大分子之間的有限空間。

【0083】 本文揭露的單結構域抗體可由本領域技術人員根據本領域已知的方法或任何未來的方法製備。例如，可以使用本領域已知的方法獲得VHH，例如藉由免疫駱駝並從中獲得與靶抗原結合並中和靶抗原的VHH，或者藉由使用本領域已知的分子生物學技術複製本發明的VHH的文庫，然後藉由使用噬菌體展示進行選擇。在一些實施方案中，本發明的單結構域抗體在駱駝科動物中天然產生，即，使用本文對於其它抗體描述的技術，用CLDN18.2或其片段免疫駱駝來生產。

【0084】在一些實施方案中，藉由用所需抗原免疫美洲駝或羊駝並隨後分離編碼重鏈抗體的mRNA來獲得單結構域抗體。藉由逆轉錄和聚合酶鏈反應，產生含有數百萬殖株的單結構域抗體的基因文庫。篩選技術如噬菌體展示和核糖體展示有助於鑒定結合抗原的殖株。其中噬菌體展示是在噬菌體上合成抗體文庫，用感興趣的抗原或其抗體結合部分篩選文庫，並分離結合抗原的噬菌體，從其中可以獲得免疫反應性片段。用於製備和篩選這種文庫的方法是本領域眾所週知的，並且用於產生噬菌體展示文庫的試劑盒可商購獲得(例如，Pharmacia重組噬菌體抗體系統，目錄號27-9400-01；以及Stratagene SurfZAP™噬菌體展示試劑盒，目錄號240612)。還有其他方法和試劑可用於產生和篩選抗體展示文庫(參見例如Barbas等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982(1991))。

【0085】當最有效的殖株被鑒定時，可藉由例如親和力成熟或人源化優化其DNA序列，以防止人體對抗抗體的免疫反應。

【0086】因此，可藉由以下方式獲得本發明的單結構域抗體：(1)分離天然存在的重鏈抗體的VHH結構域；(2)藉由表達編碼天然存在的VHH結構域的核苷酸序列；(3)藉由天然存在的VHH結構域的“人源化”或藉由表達編碼這種人源化VHH結構域的核酸；(4)藉由來自任何動物物種，特別是哺乳動物物種，例如來自人的天然存在的VH結構域的“駱駝化”，或藉由表達編碼這種駱駝化VH結構域的核酸；(5)藉由“結構域抗體”或“dAb”的“駱駝化”(參見例如Ward等人，1989，*Nature* 341：544-546)，或藉由表達編碼這種駱駝化VH結構域的核酸；(6)藉由使用合成或半合成技術製備蛋白質、多肽或其他氨基酸序列；(7)藉由使用用於核酸合成的技術製備編碼VHH的核酸，然後表達由此獲得的核酸；和/或(8)藉由前述的任何組合。基於本文的揭露

內容，用於執行前述內容的合適方法和技術對於本領域技術人員將是清楚的，並且包括例如下文更詳細描述的方法和技術。

【0087】單結構域抗體通常藉由從免疫動物獲得的血液、淋巴結或脾淋巴細胞的cDNA經PCR複製可變結構域庫至噬菌體展示載體中而產生。通常藉由在固定化抗原(例如塗佈在試管塑膠表面的抗原，固定在鏈黴抗生物素蛋白珠上的生物素化抗原或細胞表面上表達的膜蛋白)上淘選相應文庫來選擇抗原特異性單結構域抗體。藉由體外模擬該策略可以提高sdAb的親和力，例如藉由CDR區的定點誘變和在增加的嚴格條件(更高溫度，高或低鹽濃度，高或低pH和低抗原濃度)下對固定化抗原進行進一步的淘選(Wesolowski等人.，Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* (2009) 198: 157-174)。

【0088】用於製備特異性結合抗原或表位的VHH的方法描述於參考文獻中，參見例如：R. van der Linden等人.，*Journal of Immunological Methods*，240(2000) 185-195; Li等人.，*J Biol Chem.*，287(2012)13713-13721; Deffar等人.，*African Journal of Biotechnology Vol. 8(12)*，pp.2645，17 June，2009和WO94/04678。

【0089】在一些實施方案中，CLDN18.2結合分子中的VHH與抗體的Fc結構域(例如IgG(例如IgG1或IgG4)的Fc結構域)融合。藉由將VHH融合至Fc結構域，可以更有效地募集效應功能，例如ADCC和CDC。而且，VHH與Fc結構域的融合可以說明CLDN18.2結合分子形成二聚體，並且還可以幫助延長CLDN18.2結合分子的體內半衰期。

【0090】如本文所用，術語“抗體依賴的細胞介導的細胞毒性作用”或“ADCC”是指與某些細胞毒性效應細胞(例如天然殺傷(NK)細胞，嗜中性粒

細胞和巨噬細胞)上存在的Fc受體(FcR)結合的分泌的抗體使這些細胞毒性效應細胞能夠特異性結合攜帶抗原的靶細胞並隨後用細胞毒素殺死靶細胞的細胞毒性形式。抗體“武裝”細胞毒性細胞對於這種殺傷是絕對需要的。介導ADCC的主要細胞NK細胞僅表達FcγRIII，而單核細胞表達FcγRI，FcγRII和FcγRIII。造血細胞上的FcR表達總結在Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)的464頁的表3中。為了評估感興趣分子的ADCC活性，可以進行體外ADCC測定，例如美國專利US5500362或US5821337中所述的測定方法。可用於此類測定的效應細胞包括外週血單核細胞(PBMC)和自然殺傷(NK)細胞。可選或另外地，感興趣分子的ADCC活性可以在體內評估，例如在如Clynes等人 PNAS (USA) 95:652-656 (1998)揭露的動物模型中評估。

【0091】術語“補體依賴的細胞毒性作用”或“CDC”是指在補體存在下靶細胞的裂解。經典補體途徑的啟動由補體系統的第一組分(C1q)與結合其同源抗原的抗體(適當的亞類)結合而啟動。為了評估補體活化，可以執行CDC測定，藉由例如Gazzano-Santoro等人，J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)中所述的方法。

【0092】為了便於描述，在下文中將CLDN18.2結合分子描述為CLDN18.2抗體。

能夠特異性結合CLDN18.2的特定表位的CLDN18.2抗體

【0093】在一個方面，本發明涉及特異性結合CLDN18.2、而不結合或基本不結合CLDN18.1的單結構域抗體。

【0094】本發明人首次發現，能夠特異性結合人CLDN18.2的胞外結構域1 (ECD1) 的CLDN18.2結合分子（如靶向CLDN18.2的單結構域抗體）。

【0095】如前所述，CLDN18.2有兩個胞外結構域(ECD)，其中人CLDN18.2的全長序列如SEQ ID NO: 15所示。其中，ECD1為SEQ ID NO: 15的第28-80位氨基酸，如SEQ ID NO: 19所示。

SEQ ID NO: 15：

MAVTACQGLGFVVSLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQG
LWRSCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSI
FALKCIRIGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNF
WMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGMMM
CIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKI
YDGGARTEDEVQSYPSKHDIYV

SEQ ID NO: 19：

DQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLLGLPA
MLQAVR

【0096】此外，小鼠CLDN18.2如SEQ ID NO: 17所示。

SEQ ID NO: 17：

MSVTACQGLGFVVSLIGFAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQG
LWRSCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGVIGILVSI
FALKCIRIGSMDDSAKAKMTLTSGILFIISGICAIIGVSVFANMLVTNFWM
STANMYSGMGGMGGMVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVM
MCIACRGLTPDDSNFKAVSYHASGQNVAYRPGGFKASTGFGSNTRNKK
IYDGGARTEDEQSHPTKYDIYV

【0097】對於人和小鼠的CLDN18.1而言，其序列分別如SEQ ID NO: 16和SEQ ID NO: 18所示。

SEQ ID NO: 16：

MSTTTCQVVAFLLSILGLAGCIAATGMDMWSTQDLYDNPVTSVVFQYEG
 LWRSCVVRQSSGFTECRPYFTILGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSI
 FALKCIRIGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNF
 WMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGMMM
 CIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKI
 YDGGARTEDEVQSYPSKHDIYV

SEQ ID NO: 18 :

MATTTTCQVVGLLLSLLGLAGCIAATGMDMWSTQDLYDNPVTAVFQYE
 GLWRSCVQQSSGFTECRPYFTILGLPAMLQAVRALMIVGIVLGVIGILVS
 IFALKCIRIGSMDDSAKAKMTLTSGILFIISGICAIIGVSVFANMLVTNFW
 MSTANMYSGMGGMGGMVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGV
 MMCIACRGLTPDDSNFKAVSYHASGQNVAYRPGGFKASTGFGSNTRN
 KKIYDGGARTEDEEQSHPTKYDIYV

包含與特定序列具有序列同一性的CDR的CLDN18.2抗體

【0098】在一些實施方案中，本揭露的CLDN18.2抗體包含至少一個免疫球蛋白單可變結構域(例如VHH)，其中該VHH包含CDR1、CDR2和CDR3，並且其中CDR1包含與SEQ ID NO：1至少80%相同的氨基酸序列，CDR2包含與SEQ ID NO：2至少80%相同的氨基酸序列，和CDR3包含與SEQ ID NO：3至少80%相同的氨基酸序列。

【0099】除非另有說明，否則將氨基酸分配給每個CDR可以根據以下提供的編號方案之一：Kabat等人 (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5th Ed.), US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242; Chothia等人, 1987, PMID: 3681981; Chothia等人, 1989, PMID: 2687698; MacCallum等人, 1996, PMID: 8876650; 或Dubel, Ed.

第 28 頁，共 82 頁(發明說明書)

(2007) *Handbook of Therapeutic Antibodies*, 3rd Ed., Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. ◦

【0100】抗體序列中的可變區和CDR可以根據本領域已經開發的一般規則(如上所述，例如Kabat編號系統)或藉由將序列與已知可變區的資料庫比對來鑒定。在Kontermann and Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, New York, NY, 2001和Dinarello等人, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000中描述了鑒定這些區域的方法。抗體序列的示例性資料庫描述於並可獲自 www.bioinf.org.uk/abs 上的“Abysis”網站(由Department of Biochemistry & Molecular Biology University College London, London, England 的 A.C. Martin 維護)和 VBASE2 網站 www.vbase2.org，如Retter等人, *Nucl. Acids Res.*, 33 (Database issue): D671-D674 (2005)中所述。較佳使用Abysis資料庫分析序列，其整合了來自Kabat、IMGT和蛋白質資料庫(PDB)的序列資料與來自PDB的結構資料，參見Dr. Andrew C. R. Martin所著的書中的*Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. In: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg, ISBN-13: 978-3540413547，也可在網站bioinforg.uk/abs上獲得)。Abysis資料庫網站還包括已經開發用於識別可以根據本文的教導使用的CDR的一般規則。

【0101】兩個氨基酸序列之間的百分比同一性可以使用E. Meyers和W. Miller的演算法(*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988))確定，該演算法已被併入ALIGN程式(版本2.0)，使用PAM120權重殘基表，空位長度罰分為12，空位罰分為4。另外，兩個氨基酸序列之間的百分比同一性可以藉由Needleman和Wunsch的演算法(*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970))確定，其已併

入GCG套裝軟體(可從<http://www.gcg.com>獲得)中的GAP程式中，使用Blossum 62矩陣或PAM250矩陣，空隙權重為16、14、12、10、8、6或4，長度權重為1、2、3、4、5或6。

【0102】另外地或可選地，本發明的蛋白質序列可以進一步用作“查詢序列”來執行針對公共資料庫的搜索以例如識別相關序列。這種搜索可以使用Altschul等人, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10的XBLAST程式(版本2.0)來執行。可用XBLAST程式進行BLAST蛋白質搜索，得分= 50，字長= 3，以獲得與本發明的抗體分子同源的氨基酸序列。為了獲得用於比較目的的空位比對，可使用空位BLAST，如Altschul等人, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402中所述的。當使用BLAST和空位BLAST程式時，可以使用各個程式(例如，XBLAST和NBLAST)的默認參數，參見www.ncbi.nlm.nih.gov。

【0103】在另一些實施方案中，CDR的氨基酸序列可以與上文給出的各個序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

包含具有氨基酸添加、缺失或取代的CDR的CLDN18.2抗體

【0104】在一些實施方案中，本揭露的CLDN18.2抗體包含至少一個免疫球蛋白單可變結構域(例如VHH)，其中該VHH包含CDR1、CDR2和CDR3，並且其中CDR1在氨基酸序列上與SEQ ID NO：1存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異；CDR2在氨基酸序列上與SEQ ID NO：2存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異；和/或CDR3在氨基酸序列上與SEQ ID NO：3存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異。例如，CDR1、CDR2和CDR3分別與SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：

2和SEQ ID NO：3所示的氨基酸序列存在僅一個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異。

【0105】較佳地，分離的抗體或其抗原結合部分的CDR含有不多於2個氨基酸或不多於1個氨基酸的保守取代。如本文所用，術語“保守取代”是指不會不利地影響或改變包含氨基酸序列的蛋白質/多肽的基本性質的氨基酸取代。例如，保守取代可以藉由本領域已知的標準技術（例如定點誘變和PCR介導的誘變）引入。保守氨基酸取代包括其中氨基酸殘基被具有相似側鏈的另一氨基酸殘基取代的取代，例如物理或功能相似的殘基（例如具有相似的大小、形狀、電荷、化學性質包括形成共價鍵或氫鍵的能力等）被相應的氨基酸殘基的取代。本領域已經定義了具有相似側鏈的氨基酸殘基家族。這些家族包括具有鹼性側鏈的氨基酸（例如賴氨酸、精氨酸和組氨酸）、具有酸性側鏈的氨基酸（例如天冬氨酸和谷氨酸）、具有不帶電荷的極性側鏈的氨基酸（例如甘氨酸、天冬醯胺、穀氨醯胺、絲氨酸、蘇氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、具有非極性側鏈的氨基酸（例如丙氨酸、纈氨酸、亮氨酸、異亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、具有 β -分支側鏈的氨基酸（例如蘇氨酸、纈氨酸、異亮氨酸）和具有芳香族側鏈的氨基酸（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、組氨酸）。因此，相應的氨基酸殘基較佳被來自相同側鏈家族的另一個氨基酸殘基取代。用於鑒定氨基酸保守取代的方法在本領域中是公知的（參見例如Brummell等人, *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi等人, *Protein Eng.* 12(10): 879-884 (1999); 和Burks等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997)，其藉由引用併入本文）。

【0106】在某些實施方案中，CLDN18.2抗體的免疫球蛋白單可變結構域包含：

- i) 如SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1；
- ii) 如式ISRGGX₁T所示的氨基酸序列的CDR2，其中X₁為T或S；和
- iii) 如式NAQAWDX₂GTX₃RYLEV所示的氨基酸序列的CDR3，其中X₂為P或V，X₃為F或I。

【0107】在某些實施方案中，CLDN18.2抗體的免疫球蛋白單可變結構域包含：

- i) 如SEQ ID NO：30、33、34、35、36、38、39或40所示的氨基酸序列的CDR1；
- ii) 如式X₄STGGTT所示的氨基酸序列的CDR2，其中X₄為I或M；和
- iii) 如式NVLVX₅SGIGSX₆LEV所示的氨基酸序列的CDR3，其中X₅為I或V，X₆為H或T。

包含CDR的CLDN18.2抗體

【0108】在一些實施方案中，本揭露的CLDN18.2抗體包含至少一個免疫球蛋白單可變結構域(例如VHH)，其中該VHH包含CDR1、CDR2和CDR3，並且其中CDR1、CDR2和CDR3選自：

- (a)包含SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO：2所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO：3所示的氨基酸序列的CDR3；
- (b)包含SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO：4所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO：5所示的氨基酸序列的CDR3；或
- (c)包含SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO：2所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO：6所示的氨基酸序列的CDR3。

【0109】在一些實施方案中，本揭露的CLDN18.2抗體包含至少一個免疫球蛋白單可變結構域(例如VHH)，其中該VHH包含CDR1、CDR2和CDR3，並且其中CDR1、CDR2和CDR3選自：

(a)包含SEQ ID NO：30所示的氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO：32所示的氨基酸序列的CDR3；

(b)包含SEQ ID NO：30所示的氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；

(c)包含SEQ ID NO：33所示的氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；

(d)包含SEQ ID NO：33所示的氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；

(e)包含SEQ ID NO：34所示的氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；

(f)包含SEQ ID NO：35所示的氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；

(g)包含SEQ ID NO：36所示的氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；

(h)包含SEQ ID NO：38所示的氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；

(i)包含SEQ ID NO：39所示的氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO：41所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；或

(j)包含SEQ ID NO：40所示的氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3。

【0110】 在一些實施方案中，本揭露的CLDN18.2抗體包含至少一個免疫球蛋白單可變結構域(例如VHH)，其中該VHH包含CDR1、CDR2和CDR3，並且其中CDR1、CDR2和CDR3選自：

(a)如SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：2所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：3所示的氨基酸序列的CDR3；

(b)如SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：4所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：5所示的氨基酸序列的CDR3；或

(c)如SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：2所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：6所示的氨基酸序列的CDR3。

【0111】 在一些實施方案中，本揭露的CLDN18.2抗體包含至少一個免疫球蛋白單可變結構域(例如VHH)，其中該VHH包含CDR1、CDR2和CDR3，並且其中CDR1、CDR2和CDR3選自：

(a)如SEQ ID NO：30所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：32所示的氨基酸序列的CDR3；

(b)如SEQ ID NO：30所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；

(c)如SEQ ID NO：33所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；

- (d)如SEQ ID NO：33所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；
- (e)如SEQ ID NO：34所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；
- (f)如SEQ ID NO：35所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；
- (g)如SEQ ID NO：36所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；
- (h)如SEQ ID NO：38所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；
- (i)如SEQ ID NO：39所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：41所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；和
- (j)如SEQ ID NO：40所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3。

藉由VHH序列定義的CLDN18.2抗體

【0112】在一些實施方案中，本揭露的CLDN18.2抗體包含至少一個(例如，一個)免疫球蛋白單可變結構域(例如VHH)，其中該VHH包含：

- (A)SEQ ID NO：7、47或63所示的氨基酸序列；
- (B)與SEQ ID NO：7、47或63至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列；或
- (C)與SEQ ID NO：7、47或63相比具有一個或多個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

【0113】在一些實施方案中，本揭露的CLDN18.2抗體包含至少一個(例如，一個)免疫球蛋白單可變結構域(例如VHH)，其中該VHH：

(A)由SEQ ID NO：7、47或63所示的氨基酸序列組成；

(B)由與SEQ ID NO：7、47或63至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列組成；或

(C)由與SEQ ID NO：7、47或63相比具有一個或多個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列組成。

【0114】在其他實施方案中，該VHH的氨基酸序列可以與上述各個序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。作為說明性實例，抗體可以包含與SEQ ID NO：7、47或63具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VHH。

【0115】在一些進一步的實施方案中，本揭露的CLDN18.2抗體可以包含重鏈可變區中的氨基酸的保守取代或修飾。本領域理解的是，可以進行某些不消除抗原結合性質的保守序列修飾。參見例如 Brummell等人 (1993) *Biochem* 32:1180-8; de Wildt等人 (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41; Komissarov等人 (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864- 26870; Hall等人 (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12; Kelley and O' Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35; Adib-Conquy等人 (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6和Beers等人 (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43。

【0116】在某些實施方案中，本揭露的單結構域CLDN18.2抗體在SEQ ID NO: 7的以下位點中的一個或多個發生修飾(例如，氨基酸的取代)：第1、4、5、14、16、35、47、56、58、65、92、102、105或121位氨基酸。在某些實施方案中，本揭露的單結構域CLDN18.2抗體在SEQ ID NO: 47的以下位點中的一個或多個發生修飾(例如，氨基酸的取代)：第1、4、5、11、27、28、29、30、31、32、35、51、75、76、92、100、106或120位氨基酸。

【0117】在某些具體實施方案中，本揭露的單結構域CLDN18.2抗體的可變區包含SEQ ID NO: 7-14和SEQ ID NO: 42-51、63中的任一者。

【0118】在某些具體實施方案中，本揭露的單結構域CLDN18.2抗體的可變區由SEQ ID NO: 7-14和SEQ ID NO: 42-51、63中的任一者組成。

編碼本揭露的抗體的核酸分子

【0119】在一些方面，本發明涉及分離的核酸分子，其包含編碼本揭露的CLDN18.2抗體或其可變區片段的核酸序列。

【0120】本發明的核酸可以使用標準分子生物學技術獲得。對於從免疫球蛋白基因文庫獲得的抗體(例如，使用噬菌體展示技術)，編碼這種抗體的核酸可以從基因文庫中回收。

【0121】本發明的示例性核酸分子的序列如SEQ ID NO: 22-29、SEQ ID NO: 52-61和64中任一者所示。

【0122】在一些實施方案中，該核酸分別與SEQ ID NO: 22-29和52-61、64中任一者所示的核酸分子具有至少80%(例如至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性。在一些實施方案中，同一性的百分比源自遺傳密碼的簡並性，並且編碼的蛋白質序列保持不變。

【0123】可以使用本領域已知的重組技術將編碼本揭露的CLDN18.2抗體的核酸分子插入載體以進一步複製(擴增DNA)或用於表達。許多載體是可用的。載體或載體組分通常包括但不限於以下一種或多種：信號序列、複製起點、一個或多個標記基因、增強子元件、啟動子(例如SV40、CMV、EF-1 α)、和轉錄終止序列。選擇標記基因有助於選擇導入了載體的宿主細胞(參見例如美國專利號4,399,216；4,634,665和5,179,017)。例如，通常選擇標記基因賦予載體已經導入其中的宿主細胞對藥物(例如G418，潮黴素或甲

氨蝶呤)的抗性。在一個實施方案中，選擇標記基因可以包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(用於具有甲氨蝶呤選擇/擴增的dhfr-宿主細胞)和neo基因(用於G418選擇)。在另一個實施方案中，抗體可以藉由本領域已知的同源重組產生。編碼單殖株抗體的DNA易於使用常規方法分離和測序(例如，藉由使用能夠與編碼抗體重鏈的基因特異性結合的寡核苷酸探針)。

【0124】 在一些實施方案中，載體系統包括哺乳動物、細菌、酵母系統等，並包括質粒，例如，但不限於，pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pCMV、pEGFP、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS420、pLexA、pACT2.2等等，以及其他實驗室和商業可用的載體。合適的載體可以包括質粒或病毒載體(例如複製缺陷型逆轉錄病毒，腺病毒和腺伴隨病毒)。在本發明的一個實施方案中，載體可以是pET，例如含有六組氨基酸標籤和c-Myc-標籤基因的pETbac。

【0125】 包含編碼本揭露的CLDN18.2抗體的核酸序列的載體可以被引入宿主細胞用於複製或基因表達。用於在本文的載體中複製或表達DNA的合適宿主細胞是原核生物、酵母或高等真核生物細胞。用於該目的的合適原核生物包括真細菌，例如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體，例如腸桿菌科如埃希氏菌屬，例如大腸桿菌、腸桿菌屬、歐文氏菌屬、克雷伯氏菌屬、變形桿菌屬、沙門氏菌屬，例如鼠傷寒沙門氏菌、沙雷氏菌屬，例如黏質沙雷氏菌和志賀氏菌，以及芽孢桿菌屬如枯草芽孢桿菌和地衣芽孢桿菌、假單胞菌屬如銅綠假單胞菌和鏈黴菌。

【0126】 除了原核生物以外，真核微生物如絲狀真菌或酵母是合適的用於表達本揭露的CLDN18.2抗體的宿主細胞。釀酒酵母或普通麵包酵母是低等

真核宿主微生物中最常用的。然而，許多其它屬、種和菌株通常是可獲得的並且可用於本發明，例如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)；克魯維酵母屬(*Kluyveromyces*)宿主，例如乳克魯維酵母(*K.lactis*)、脆壁克魯維酵母(*K.fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亞克魯維酵母(*K.bulgaricus*)(ATCC 16,045)、威克曼氏克魯維酵母(*K. wickeramii*)(ATCC 24,178)、*K.waltii*(ATCC 56,500)、果蠅克魯維酵母(*K. drosophilarum*)(ATCC 36,906)、耐熱克魯維酵母(*K.thermotolerans*)和馬克斯克魯維氏酵母(*K.marxianus*)；西洋薯黴(*Yarrowia*)(EP 402,226)；巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183,070)；念珠菌屬 (*Candida*)；*Trichoderma reesia*(EP 244,234)；粗糙鏈孢黴(*Neurospora crassa*)；許旺氏酵母屬 (*Schwanniomyces*)如西方許旺氏酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)；和絲狀真菌，例如鏈孢黴屬(*Neurospora*)、青黴屬(*Penicillium*)、*Tolyocladium*以及麴黴屬宿主如構巢麴黴(*A.nidulans*)和黑麴黴(*A. niger*)。

【0127】用於表達本揭露的CLDN18.2抗體的其他合適的宿主細胞來源於多細胞生物體。無脊椎動物細胞的實例包括植物和昆蟲細胞。目前已經從下述宿主中鑒定了大量的桿狀病毒株和變體以及相應的容許型昆蟲宿主細胞：草地夜蛾 (*Spodoptera Frugiperda*，毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*，蚊子)、白紋伊蚊 (*Aedes albopictus*，蚊子)、*Drosophila melanogaster*(果蠅)和家蠶蛾(*Bombyx mori*)。用於轉染的各種病毒株是公眾可獲得的，例如苜蓿銀紋夜蛾(*Autographa californica*)NPV的L-1變體和家蠶NPV的Bm-5株，並且根據本揭露，這些病毒可以用於CLDN18.2抗體在合適的宿主細胞中表達的轉染過程，特別是用於轉染草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)細胞。棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛花、番茄和煙草的植物細胞培養物也可用作宿主。

【0128】以上述用於本揭露的CLDN18.2抗體產生的載體轉化宿主細胞，並在用於誘導啟動子、選擇轉化體或擴增編碼所需序列的基因的根據需要修改的常規營養培養基中培養。

【0129】用於產生本揭露的CLDN18.2抗體的宿主細胞可以在各種培養基中培養。諸如Ham's F10(Sigma)，Minimal Essential Medium(MEM)，(Sigma)，RPMI-1640(Sigma)和Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM，Sigma)的商業上可獲得的培養基適於培養宿主細胞。此外，Ham等人., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes等人., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), U.S. Pat. No. 4,767,704；4,657,866；4,927,762；4,560,655；或5,122,469；WO 90/03430；WO 87/00195；或U.S. Pat. Re. 30,985中描述的任何培養基可用作宿主細胞的培養基。必要時可以用激素和/或其他生長因數(如胰島素、轉鐵蛋白或表皮生長因數)、鹽(如氯化鈉、鈣、鎂和磷酸鹽)、緩衝液(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸腺嘧啶)、抗生素(如GENTAMYCIN藥物)、微量元素(定義為無機化合物，通常以微摩爾範圍內的終濃度存在)和葡萄糖或等同能量來源添加至任何這些培養基。任何其他必需的補充劑也可以以本領域技術人員已知的適當濃度包含在內。諸如溫度、pH等培養條件是與之前選擇用於表達的宿主細胞一起使用的那些，並且對普通技術人員而言將是明顯的。

【0130】當使用重組技術時，抗體可以在細胞內，在週質空間中產生，或者直接分泌到培養基中。如果抗體在細胞內產生，作為第一步，例如藉由離心或超濾除去微粒碎片(宿主細胞或裂解片段)。Carter等人，Bio/Technology 10：163-167(1992)描述了分離分泌到大腸桿菌週質空間的抗體的方法。簡而言之，在約30分鐘內，在乙酸鈉(pH 3.5)，EDTA和苯甲基磺醯氟(PMSF)的存在下融化細胞。細胞碎片可以藉由離心去除。在抗體分泌到培養基中的情況下，通常首先使用市售的蛋白質濃縮篩檢程式，例

如Amicon或Millipore Pellicon超濾單元濃縮來自這種表達系統的上清液。蛋白酶抑制劑例如PMSF可包括在任何前述步驟中以抑制蛋白水解，並可包含抗生素以防止外來污染物的生長。

【0131】可以使用例如羧基磷灰石層析、凝膠電泳、透析、DEAE-纖維素離子交換層析、硫酸銨沉澱、鹽析和親和層析來純化從細胞製備的抗體，其中親和層析是較佳的純化技術。

【0132】在任何初步純化步驟之後，包含目標抗體和污染物的混合物可以使用pH介於約2.5-4.5之間的洗脫緩衝液進行低pH疏水相互作用色譜，較佳在低鹽濃度(例如約0-0.25M鹽)下進行。

藥物組合物

【0133】在一些方面，本發明涉及藥物組合物，其包含至少一種如本文所揭露的CLDN18.2結合分子（例如，本揭露的CLDN18.2抗體）和藥學上可接受的載體。

藥物組合物的組分

【0134】藥物組合物可以任選地含有一種或多種另外的藥物活性成分，例如另一種抗體或藥物。本發明的藥物組合物還可以與例如另一種免疫刺激劑、抗癌劑、抗病毒劑或疫苗組合施用，使得抗CLDN18.2抗體增強對疫苗的免疫反應。藥學上可接受的載體可以包括例如藥學上可接受的液體、凝膠或固體載體、水性介質、非水性介質、抗微生物劑、等滲劑、緩衝劑、抗氧化劑、麻醉劑、懸浮/分散劑、螯合劑、稀釋劑、佐劑、賦形劑或無毒的輔助物質，本領域已知的各種組分的組合或更多。

【0135】合適的組分可以包括例如抗氧化劑、填充劑、黏合劑、崩解劑、緩衝劑、防腐劑、潤滑劑、調味劑、增稠劑、著色劑、乳化劑或穩定劑如糖和環糊精。合適的抗氧化劑可包括例如甲硫氨酸、抗壞血酸、EDTA、硫

代硫酸鈉、鉑、過氧化氫酶、檸檬酸、半胱氨酸、巯基甘油、巯基乙酸、巯基山梨糖醇、丁基甲基苯甲醚、丁基化羥基甲苯和/或丙基磷酸鹽。如本發明所揭露的，在包含還原抗體或其抗原結合片段的一種或多種抗氧化劑如甲硫氨酸的含有本發明揭露的組合物的抗體或抗原結合片段的溶劑中，其可被氧化。氧化還原可防止或減少結合親和力的降低，從而增強抗體穩定性並延長保質期。因此，在一些實施方案中，本發明提供了包含一種或多種抗體或其抗原結合片段和一種或多種抗氧化劑如甲硫氨酸的組合物。本發明進一步提供了多種方法，其中將抗體或其抗原結合片段與一種或多種抗氧化劑如甲硫氨酸混合。從而，抗體或其抗原結合片段可以被防止氧化，以延長其保質期和/或增加活性。

【0136】 為了進一步說明，藥學上可接受的載體可以包括例如水性載體，例如氯化鈉注射液、林格氏注射液、等滲右旋糖注射液、無菌水注射液或右旋糖和乳酸林格氏注射液、非水性載體如植物來源的固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油或花生油、抑菌劑或抑真菌濃度的抗微生物劑、等滲劑如氯化鈉或葡萄糖、緩衝劑如磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝劑、抗氧化劑如硫酸氫鈉、局部麻醉劑如鹽酸普魯卡因、懸浮劑和分散劑如羧甲基纖維素鈉、羥丙基甲基纖維素或聚乙烯吡咯烷酮、乳化劑如聚山梨酯80(TWEEN-80)、螯合劑如EDTA(乙二胺四乙酸)或EGTA(乙二醇四乙酸)、乙醇、聚乙二醇、丙二醇、氫氧化鈉、鹽酸、檸檬酸或乳酸。用作載體的抗微生物劑可以添加到包含酚或甲酚、汞製劑、苯甲醇、氯丁醇、對羥基苯甲酸甲酯和對羥基苯甲酸丙酯、硫柳汞、苯紮氯銨和苄索氯銨的多劑量容器中的藥物組合物中。合適的賦形劑可以包括例如水、鹽水、右旋糖、甘油或乙醇。合適的無毒輔助物質可以包括例如潤濕劑或乳化劑、pH緩衝劑、穩定劑、溶解度

增強劑或諸如乙酸鈉、脫水山梨糖醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯或環糊精的試劑。

施用、製劑和劑量

【0137】 本發明的藥物組合物可以藉由各種途徑體內施用至有需要的受試者，該途徑包括但不限於口服、靜脈內、動脈內、皮下、腸胃外、鼻內、肌內、顱內、心內、心室內、氣管內、口腔、直腸、腹膜內、皮內、局部、經皮和鞘內、或者藉由植入或吸入。本發明的藥物組合物可以配製成固體、半固體、液體或氣體形式的製劑；包括但不限於片劑、膠囊劑、粉劑、顆粒劑、軟膏劑、溶液劑、栓劑、灌腸劑、注射劑、吸入劑和氣霧劑。根據預期的應用和治療方案可以選擇合適的製劑和施用途徑。

【0138】 用於腸內施用的合適製劑包括硬或軟的明膠膠囊、丸劑、片劑、包括包衣片劑、酏劑、混懸劑、糖漿劑或吸入劑及其控釋劑型。

【0139】 適用於腸胃外施用(例如藉由注射)的製劑包括活性成分溶解、懸浮於其中或以其他方式提供的(例如，在脂質體或其他微粒中)的水性或非水性、等滲、無熱原、無菌液體(例如溶液，混懸液)。這些液體可以另外含有其它藥學上可接受的成分，例如抗氧化劑、緩衝劑、防腐劑、穩定劑、抑菌劑、懸浮劑、增稠劑和使製劑與預期接受者的血液(或其他相關體液)等滲的溶質。賦形劑的實例包括例如水、醇、多元醇、甘油、植物油等。適用於此類製劑的等滲載體的實例包括氯化鈉注射液、林格溶液或乳酸林格氏注射液。類似地，特定劑量方案(即劑量、時間和重複)將取決於具體個體和個體的病史以及諸如藥代動力學(例如半衰期、清除率等)的經驗考慮。

【0140】 施用頻率可以在治療過程中確定和調整，並且基於減少增殖或致瘤細胞的數量，維持這種腫瘤細胞的減少，減少腫瘤細胞的增殖或延遲轉移的發展。在一些實施方案中，施用的劑量可以被調節或減少以控制潛在

的副作用和/或毒性。或者，本發明的用於治療的藥物組合物的持續連續釋放製劑可能是合適的。

【0141】 本領域技術人員將會理解，合適的劑量可因患者而異。確定最佳劑量通常涉及治療益處水準與任何風險或有害副作用的平衡。所選擇的劑量水準將取決於多種因素，包括但不限於特定化合物的活性、施用、施用時間、化合物清除速率、治療持續時間、其他聯合使用的藥物、化合物和/或材料、病症的嚴重程度，以及物種、患者的性別、年齡、體重、病情、一般健康狀況和以前的病史。化合物的量和施用途徑最終由醫生、獸醫或臨床醫師決定，但通常選擇劑量以達到實現所需效果的作用部位處的局部濃度，而不會導致實質性的有害或不利副作用。

【0142】 通常，CLDN18.2結合分子可以以各種劑量範圍施用。在一些實施方案中，本文提供的CLDN18.2結合分子可以以約0.01mg/kg至約100mg/kg(例如約0.01 mg/kg、約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約2 mg/kg、約5 mg/kg、約10 mg/kg、約15 mg/kg、約20 mg/kg、約25 mg/kg、約30 mg/kg、約35 mg/kg、約40 mg/kg、約45 mg/kg、約50 mg/kg、約55 mg/kg、約60 mg/kg、約65 mg/kg、約70 mg/kg、約75 mg/kg、約80 mg/kg、約85 mg/kg、約90 mg/kg、約95 mg/kg、或約100 mg/kg)的治療有效劑量施用。在這些實施方案的某些中，抗體以約50mg/kg或更低的劑量施用，並且在這些實施方案中的某些中，劑量為10mg/kg或更低，5mg/kg或更低，1mg/kg或更低，0.5mg/kg或更低，或者0.1mg/kg或更低。在某些實施方案中，施用劑量可以在治療過程中改變。例如，在某些實施方案中，初始施用劑量可以高於後續施用劑量。在某些實施方案中，取決於受試者的反應，施用劑量可以在治療過程中變化。

【0143】無論如何，本發明的抗體或其抗原結合部分較佳根據需要施用於有需要的受試者。本領域技術人員可以確定施用頻率，例如主治醫生基於所治療病症、所治療受試者的年齡、所治療病症的嚴重程度、所治療受試者的一般健康狀況等的考慮。

【0144】在某些較佳的實施方案中，涉及本發明的抗體或其抗原結合部分的治療過程將包含在數週或數月的時間內施用的多劑量的所選藥物產品。更具體地說，本發明的抗體或其抗原結合部分可以每天、每兩天、每四天、每週、每十天、每兩週、每三週、每月、每六週、每兩個月、每十週或每三個月施用。就此而言，可以理解的是，可以基於患者響應和臨床實踐來改變劑量或者調整間隔。

【0145】在給予一次或多次施用的個體中也可憑經驗確定所揭露的用於治療的藥物組合物的劑量和方案。例如，可給予個體增量劑量的如本文所述的藥物組合物。在選定的實施方案中，劑量可分別根據經驗確定，或根據觀察到的副作用或毒性逐漸增加或減少。為了評估所選擇的組合物的功效，可以跟蹤特定疾病、病症或病情的標誌物。對於癌症，這些包括藉由觸診或視覺觀察直接測量腫瘤大小，藉由X射線或其他成像技術間接測量腫瘤大小；藉由直接腫瘤活組織檢查和腫瘤樣本的顯微鏡檢查評估的改善；測量根據本文所述方法鑒定的間接腫瘤標誌物(例如用於前列腺癌的PSA)或致瘤性抗原，疼痛或麻痹的減輕；與腫瘤相關的言語、視力、呼吸或其他失能的改善；食欲增加；或藉由接受的測試測量的生活品質的提高或生存期的延長。本領域技術人員將明白，劑量將根據個體、腫瘤病情的類型、腫瘤病情的階段、腫瘤病情是否已開始轉移至個體中的其他位置以及過去使用的治療和並行使用的治療而變化。

【0146】用於腸胃外施用(例如靜脈內注射)的相容製劑可包含濃度為約10 μ g/ml至約100mg/ml的如本文提供的CLDN18.2結合分子。在一些實施方案中，CLDN18.2結合分子的濃度可包括20 μ g/ml、40 μ g/ml、60 μ g/ml、80 μ g/ml、100 μ g/ml、200 μ g/ml、300 μ g/ml、400 μ g/ml、500 μ g/ml、600 μ g/ml、700 μ g/ml、800 μ g/ml、900 μ g/ml或1mg/ml。在其他較佳的實施方案中，CLDN18.2結合分子的濃度將包括2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、8mg/ml、10mg/ml、12mg/ml、14mg/ml、16mg/ml、18mg/ml、20mg/ml、25mg/ml、30mg/ml、35mg/ml、40mg/ml、45mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml或100mg/ml。若以摩爾濃度計算，在一些實施方案中，CLDN18.2結合分子的濃度可包括例如133 nM、266 nM、400 nM、533 nM、667 nM、1.3 μ M、2 μ M、2.67 μ M、3.33 μ M、4 μ M、4.67 μ M、5.33 μ M、6 μ M或6.67 μ M。

本發明的應用

【0147】本發明的CLDN18.2結合分子具有許多體外和體內用途。

治療疾病

【0148】與CLDN18.2相關的病症和障礙可以是與免疫相關的疾病或病症，包括但不限於“涉及表達CLDN18.2的細胞的疾病”或“與表達CLDN18.2的細胞相關的疾病”或類似表述，意指CLDN18.2在患病組織或器官的細胞中表達。在一個實施方案中，與對應健康組織或器官中的狀態相比，CLDN18.2在患病組織或器官的細胞中的表達提高。提高是指提高至少10%，特別地至少20%、至少50%、至少100%、至少200%、至少500%、至少1000%、至少10000%或甚至更多。在一個實施方案中，表達僅見於患病組織，而相應健康組織中的表達被抑制。根據本發明，與表達CLDN18.2的細胞相關的

疾病包括癌症疾病。此外，根據本發明，癌症疾病較佳為其中癌細胞表達CLDN18.2的那些。

【0149】術語“癌症疾病”或“癌症”是指或描述個體中通常以不受調節的細胞生長為特徵的生理狀況。癌症的實例包括但不限於上皮癌、淋巴瘤、母細胞瘤、肉瘤和白血病。更特別地，這樣的癌症的實例包括骨癌、血癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳腺癌、前列腺癌、子宮癌、性器官和生殖器官癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌症、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、膀胱癌、腎癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)腫瘤、神經外胚層癌症、脊柱軸腫瘤、膠質瘤、腦脊膜瘤和垂體腺瘤。根據本發明的術語“癌症”還包括癌症轉移。較佳地，“癌症疾病”的特徵在於表達CLDN18.2的細胞，以及癌細胞表達CLDN18.2。表達CLDN18.2的細胞較佳是癌細胞，較佳本文中所述的癌症的癌細胞。

【0150】根據本揭露，術語“腫瘤”或“腫瘤疾病”是指細胞(被稱為贅生性細胞、腫瘤發生性細胞或腫瘤細胞)的異常生長，較佳形成腫脹或病變。“腫瘤細胞”意指藉由迅速的不受控制的細胞增殖而生長並且在引發新生長的刺激停止之後繼續生長的異常細胞。腫瘤顯示出結構組織和與正常組織的功能協調的部分或完全缺失，並且通常形成獨特的組織團塊，其可以是良性的、惡化前的或惡性的。根據本發明，“癌症疾病”較佳為“腫瘤疾病”。然而，通常術語“癌症”和“腫瘤”在本文中可互換使用。

【0151】在一個實施方案中，根據本揭露的癌症涉及表達CLDN18.2的癌細胞。在一個實施方案中，癌症是CLDN18.2陽性的。在一個實施方案中，CLDN18.2的表達是位於細胞的表面。在一個實施方案中，至少50%，較佳

60%、70%、80%或90%的癌細胞是CLDN18.2陽性的，和/或至少40%，較佳至少50%的癌細胞對CLDN18.2的表面表達呈陽性。在一個實施方案中，至少95%或至少98%的癌細胞是CLDN18.2陽性的。在一個實施方案中，至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的癌細胞對於CLDN18.2的表面表達是陽性的。

【0152】 在一個實施方案中，表達CLDN18.2的癌症、涉及表達CLDN18.2的癌細胞的癌症或CLDN18.2陽性癌症選自：胃癌、食道癌、胰腺癌、肺癌(例如非小細胞肺癌(NSCLC))、卵巢癌、結腸癌、肝癌、頭頸癌和膽囊癌，及其轉移，特別是胃癌轉移(例如克魯肯貝格瘤)、腹膜轉移和淋巴結轉移。在一個實施方案中，癌症是腺癌，特別是晚期腺癌。特別較佳的癌症疾病是胃、食管、胰管、膽管、肺和卵巢的腺癌。在一個實施方案中，癌症選自胃癌、食道癌(特別是下食道癌)、食管-胃接合部的癌症和胃食道癌。在一個特別較佳的實施方案中，癌症是胃食道癌，例如轉移性、頑固性或復發性晚期胃食道癌。

【0153】 此外，本揭露的抗體或其抗原結合部分可以與化學療法或放射療法組合使用。

與化療組合使用

【0154】 抗體或其抗原結合部分可以與抗癌劑、細胞毒性劑或化學治療劑組合使用。

【0155】 術語“抗癌劑”或“抗增殖劑”意指可用於治療細胞增殖性病例如癌症的任何藥劑，並且包括但不限於細胞毒性劑、細胞抑制劑、抗血管生成劑、放射療法和放射治療劑、靶向抗癌劑、BRM、治療性抗體、癌症疫苗、細胞因數、激素療法、放射療法和抗轉移劑和免疫治療劑。應該理解的是，在如上所述的選定實施方案中，此類抗癌劑可以包含綴合物並

且可以在施用之前與揭露的位點特異性抗體結合。更具體而言，在一些實施方案中，將選擇的抗癌劑連接至工程化抗體的不配對半胱氨酸以提供如本文所述的工程化偶聯物。因此，這樣的工程化綴合物被明確地考慮在本發明的範圍內。在其他實施方案中，所揭露的抗癌劑將與包含如上所述的不同治療劑的位點特異性綴合物組合施用。

【0156】如本文所用，術語“細胞毒性劑”是指對細胞有毒並降低或抑制細胞功能和/或引起細胞破壞的物質。在一些實施方案中，該物質是源自活生物體的天然存在的分子。細胞毒性劑的實例包括但不限於細菌(例如，白喉毒素、假單胞菌內毒素和外毒素、葡萄球菌腸毒素A)、真菌(例如 α -八疊球菌素、侷限麩黴素)、植物(相思豆毒蛋白、蓖麻毒素、葫蘆根毒素、槲寄生素、美洲商陸抗病毒蛋白、皂草素、白樹毒素、momoridin、天花粉蛋白、大麥毒素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、*Phytolacca mericana*蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制劑、麻風樹毒蛋白、巴豆毒素、石鹼草抑制劑、白樹毒素、mitegellin、侷限麩黴素、酚黴素、新黴素和單端孢黴烯族化合物)或動物(例如細胞毒性RNA酶，如胞外胰腺RNA酶；DNA酶I，包括其片段和/或變體)的小分子毒素或酶促活性毒素。

【0157】為了本發明的目的，“化學治療劑”包括非特異性降低或抑制癌細胞的生長、增殖和/或存活的化學化合物(例如細胞毒性劑或細胞抑制劑)。這些化學試劑通常針對細胞生長或分裂所需的細胞內過程，因此對於通常快速生長和分裂的癌細胞特別有效。例如，長春新鹼使微管解聚，從而抑制細胞進入有絲分裂。通常，化學治療劑可以包括抑制或被設計用於抑制癌細胞或可能變成性或產生致瘤後代(例如TIC)的細胞的任何化學藥劑。這些藥劑通常是組合使用的，並且通常是最有效的，例如，在諸如CHOP或FOLFIRI的方案中。

【0158】可以與本發明的位點特異性建構體組合使用的抗癌劑(作為位點特異性綴合物的組分或未綴合狀態)的實例包括但不限於烷化劑、烷基磺酸鹽、氮丙啶、乙烯亞胺和甲基三聚氰胺、多聚乙醯(acetogenins)、喜樹鹼、苔蘚抑素、卡利士他汀(callystatin)、CC-1065、克瑞托欣(cryptophycins)、朵拉司他汀、多卡米星、艾榴素(eleutherobin)、水鬼蕉鹼、沙克迪因(sarcodictyin)、海綿素(spongistatin)、氮芥、抗生素、烯二炔類抗生素、dynemicin、雙膦酸鹽、埃斯波黴素、色素蛋白烯二炔抗生素發色團、阿克拉黴素類(aclacinomysins)、放線菌素、安麩黴素、偶氮絲氨酸、博萊黴素、放線菌素C、卡拉賓辛(carabycin)、洋紅黴素、嗜癌黴素、色黴素類(chromomycinis)、更生黴素、柔紅黴素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN[®]多柔比星、表柔比星、依索比星、伊達比星、麻西羅黴素、絲裂黴素、黴酚酸、諾加黴素、橄欖黴素、培洛黴素、博地黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素、三鐵阿黴素、羅多比星、鏈黑菌素、鏈脲菌素、殺結核菌素、烏苯美司、淨司他丁、佐柔比星；抗-代謝物、埃羅替尼、威羅菲尼、克唑替尼、索拉非尼、依魯替尼、恩雜魯胺、葉酸類似物、嘌呤類似物、雄激素、抗-腎上腺素、葉酸補充劑如弗林酸(frolic acid)、醋葡萄醛內酯、醛磷醯胺糖苷、氨基乙醯丙酸、恩尿嘧啶、安吡啶、貝斯布希(bestrabucil)、比生群、依達曲沙、迪夫法明(defofamine)、秋水仙胺、地吡醌、艾夫尼辛(elfornithine)、依利醋銨、愛波喜龍、依託格魯、硝酸鎂、羥基脲、香菇多糖、氯尼達明、美坦生類化合物(maytansinoids)、米托胍脲、米托蒽醌、莫丹摩爾(mopidanmol)、尼特林(nitraerine)、噴司他丁、蛋氨酸芥、吡柔比星、洛索蒽醌、鬼臼酸、2-乙基胍、丙卡巴胍、PSK[®]多糖複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)、雷佐生；根黴素；西佐喃；鎳螺胺；替奴佐酸；三亞胺醌；2,2',2"-三氯三乙胺；單端孢黴烯類(尤其是T-2毒素、

維拉庫林A(verracurin A)、桿孢菌素A和蛇形菌素)；烏拉坦；長春地辛；達卡巴嗪；甘露莫司汀；二溴甘露醇；二溴衛矛醇；呱泊溴烷；凱西托欣(gacytosine)；阿拉伯糖苷("Ara-C")；環磷醯胺；噻替派；紫杉烷類；苯丁酸氮芥(chloranbucil)；GEMZAR®吉西他濱；6-硫代鳥嘌呤；巯嘌呤；氨甲喋呤；鉑類似物；長春鹼；鉑；依託泊苷(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌；長春新鹼，NAVELBINE®長春瑞濱；諾消靈；替尼泊苷；依達曲沙；柔紅黴素；氨基蝶呤；希羅達；伊班膦酸鹽；伊立替康(Camptosar, CPT-11)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥氨酸；類視色素；卡培他濱；考布他汀；甲醯四氫葉酸；奧沙利鉑；PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFR和VEGF-A的抑制劑(其減少細胞增殖)，以及上述任一項的藥學上可接受的鹽、酸或衍生物。這一定義中還包括用於調節或抑制對腫瘤的激素作用的抗激素劑，諸如抗雌激素和選擇性雌激素受體調節劑、抑制調節腎上腺中的雌激素產生的芳香酶的芳香酶抑制劑，和抗-雄激素；以及曲沙他濱(1,3-二氧雜環戊烷核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸、核酶諸如VEGF表達抑制劑和HER2表達抑制劑；疫苗，PROLEUKIN® rIL-2；LURTOTECAN®拓撲異構酶1抑制劑；ABARELIX® rmRH；長春瑞濱和埃斯波黴素，以及上述任一項的藥學上可接受的鹽、酸或衍生物。

與放射療法組合使用

【0159】本發明還提供了抗體或其抗原結合部分與放射療法(即，用於在腫瘤細胞內局部誘導DNA損傷的任何機制，例如 γ -照射、X-射線、UV-照射、微波、電子發射等)的組合。還考慮了使用放射性同位素至腫瘤細胞的定向遞送的聯合療法，並且所揭露的綴合物可以與靶向的抗癌劑或其他靶向手段結合使用。通常，放射療法在約1週至約2週的時間段內以脈衝方式施用。

放射療法可以對患有頭頸癌的受試者施用約6至7週。任選地，放射療法可以作為單劑量或作為多個順序劑量施用。

診斷

【0160】 本發明提供了用於檢測、診斷或監測增殖性病症的體外和體內方法以及篩選來自患者的細胞以鑒定腫瘤細胞包括致瘤細胞的方法。這樣的方法包括鑒定用於治療的患有癌症的個體或監測癌症的進展，包括將患者或從患者獲得的樣品(體內或體外)與本文所述的抗體接觸，並檢測樣品中與結合的或游離的靶分子的結合的抗體的存在或不存在或結合水準。在一些實施方案中，抗體將包含可檢測標記或報導分子。

【0161】 在一些實施方案中，抗體與樣品中特定細胞的結合可表示樣品可能含有致瘤細胞，從而表明具有癌症的個體可用本文所述的抗體有效治療。

【0162】 可以藉由多種測定法分析樣品，例如放射免疫測定法、酶免疫測定法(例如ELISA)、競爭結合測定法、螢光免疫測定法、免疫印跡測定法、Western印跡分析和流式細胞術測定法。相容的體內診斷或診斷測定可以包括本領域公知的成像或監測技術，例如本領域技術人員已知的磁共振成像，電腦化斷層攝影(例如CAT掃描)，正電子斷層掃描(例如PET掃描)，放射線照相術，超音波等。

藥物包裝和試劑盒

【0163】 本發明還提供了包含一個或多個劑量的抗體或其抗原結合部分的一個或多個容器的藥物包裝和試劑盒。在一些實施方案中，提供單位劑量，其中單位劑量含有預定量的組合物，該組合物包含例如抗體或其抗原結合部分，具有或不具有一種或多種其他試劑。對於其他實施方案，這種單位劑量以一次性使用的預充式注射用注射器供應。在其他實施方案中，單位劑量中包含的組合物可以包含鹽水、蔗糖或類似物；緩衝液，如磷酸鹽等；

和/或配製在穩定和有效的pH範圍內。或者，在一些實施方案中，該組合物是綴合物組合物，其可以作為凍乾粉末提供並在加入合適的液體(例如無菌水或鹽溶液)後重建。容器上或與容器相關聯的任何標籤指示封裝的綴合物組合物用於治療選擇的腫瘤疾病狀況。在一些較佳的實施方案中，組合物包含一種或多種抑制蛋白質聚集的物質，包括但不限於蔗糖和精氨酸。

【0164】 本發明還提供了用於產生位點特異性綴合物以及任選地一種或多種抗癌劑的單劑量或多劑量施用單元的試劑盒。該試劑盒包括容器以及在容器上或與容器相關聯的標籤或包裝插頁。合適的容器包括例如瓶、小瓶、注射器等。容器可以由多種材料形成，例如玻璃或塑膠，並且包含藥學有效量的所揭露的綴合或非綴合形式的綴合物。在其他較佳實施例中，容器包括無菌存取口(例如容器可以是靜脈內溶液袋或具有可被皮下注射針頭刺穿的塞子的小瓶)。這樣的試劑盒通常在合適的容器中包含工程化偶聯物的藥學上可接受的製劑，並且任選地在相同或不同的容器中包含一種或多種抗癌劑。試劑盒還可以含有其他藥學上可接受的製劑，用於診斷或組合治療。例如，除了本發明的抗體或其抗原結合部分之外，這樣的試劑盒可以含有任何一種或多種抗癌劑，例如化學治療劑或放射治療劑；抗血管生成劑；抗轉移劑；靶向抗癌劑；細胞毒性劑；和/或其他抗癌劑。

【0165】 更具體地說，試劑盒可以具有含有所揭露的抗體或其抗原結合部分的單個容器，其含有或不含另外的組分，或者它們可以具有用於每種所需試劑的不同容器。在提供用於綴合的組合治療劑的情況下，可以按摩爾當量組合或一種組分多於另一種的方式預混合單一溶液。或者，試劑盒的綴合物和任何任選的抗癌劑可以在施用於患者之前分開保存在不同的容器中。試劑盒還可以包含用於容納無菌藥學上可接受的緩衝液或其他稀釋劑

例如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、林格氏溶液和葡萄糖溶液的第二/第三容器裝置。

【0166】 當試劑盒的組分以一種或多種液體溶液提供時，液體溶液較佳為水溶液，特別較佳無菌水溶液或鹽水溶液。然而，試劑盒的組分可以作為乾粉提供。當試劑或組分以乾粉形式提供時，可以藉由添加合適的溶劑來重構粉末。可以設想溶劑也可以提供於另一個容器中。

【0167】 如上簡要所述，該試劑盒還可含有向患者施用抗體或其抗原結合部分和任何任選組分的工具，例如一種或多種針，I.V.袋或注射器，或者甚至滴眼器、移液管或其他類似裝置，藉由其可以將製劑注射或引入動物體內或將其施用於身體的患病區域。本發明的試劑盒通常還包括用於容納小瓶或類似物的裝置以及用於商業銷售的其他緊密封閉的部件，例如注射或吹塑塑膠容器，其中放置並且保持所需的小瓶和其他裝置。

本發明的優勢

【0168】 針對CLDN18.2、特別是人CLDN18.2開發抗體至少具有如下優勢：第一，人CLDN18.2高表達於癌症細胞，而在正常細胞中，僅特異性表達於胃上皮細胞中，因此毒副作用低，成藥可能性更高；

第二，CLDN18.2表達於胃上皮細胞的緊密連接中，相對較鬆散的癌症細胞，抗體不易於作用；即使上皮細胞被抗體殺傷，上皮細胞之下的幹細胞因為不表達CLDN18.2，可以藉由分化進而補充損傷的胃上皮細胞；

第三，針對CLDN18.2的抗體不僅可以藉由ADCC和CDC殺傷細胞，還可以藉由抗體交聯CLDN18.2從而介導細胞的凋亡，而且可以一定程度抑制細胞的增殖。

【0169】 至今，還沒有針對CLND18.2的奈米抗體，奈米抗體作為一種新型的抗體，已經有一個抗體caplacizumab獲批上市，充分說明奈米抗體的可成

藥性。此種抗體相對於其它抗體具有顯著的優點，如其半衰期長短可藉由化學修飾或者蛋白融合改造進行調節、滲透性強、可識別普通抗體不可及的隱蔽表位、耐胃蛋白酶、耐酸、耐熱、易生產，而且因為是單鏈，易於和其它類型抗體組裝為雙價抗體和多價抗體。

【0170】 在本發明的部分實施方案中，針對CLDN18.2的抗體是藉由羊駝免疫庫篩選得到，在此基礎上，C末端和IgG1的Fc片段融合，目前部分候選抗體在細胞水準CDC和ADCC的實驗結果都表現出比對照抗體更好或至少相當的活性。結合CLDN18.2靶點的特性，此抗體用於癌症的免疫治療，具有更低的毒副作用和更佳的臨床藥效，將給患者提供更多的藥物選擇。

實施例

【0171】 藉由參考以下實施例將更容易地理解本文一般地描述的本發明，這些實施例是以舉例說明的方式提供的，並且不旨在限制本發明。這些實施例並不旨在表示下面的實驗是全部或僅進行的實驗。

實施例1

過表達細胞株以及腫瘤細胞株的建構與鑒定

【0172】 在本實施例中，分別建構了不同類型的過表達細胞株以及腫瘤細胞株，並對其進行流式鑒定。

1. 過表達細胞株的建構與鑒定

【0173】 將全長人CLDN18.1 (SEQ ID NO:16)、鼠CLDN18.2 (SEQ ID NO:17)、鼠CLDN18.1 (SEQ ID NO:18)的核酸序列建構至pLVX-puro質粒(Clontech, Cat#632164)上。然後，將所得到的質粒藉由電轉化至HEK293細胞(ATCC® CRL-1573™)中。藉由篩選，得到表達全長人CLDN18.1的過表達細胞株(人CLDN18.1-HEK293)、表達鼠CLDN18.2的過表達細胞株(鼠CLDN18.2-HEK293)和表達鼠CLDN18.1的過表達細胞株(鼠

CLDN18.1-HEK293)。其後，藉由 IMAB362 抗體（根據專利 US20180127489A1 所披露的序列資訊表達、純化制得）以及識別 C 端 CLDN18 胞內段（GFKASTGFGSNTKN，SEQ ID NO: 21）的抗 CLDN18 抗體 [34H14L15]（Abcam，ab203563）進行流式細胞術鑒定，獲得成功轉化的過表達細胞株，具體方法如下。

1.1 電轉化

【0174】 首先，復甦及培養 HEK293 細胞，連續傳代 2-3 次，轉染前一天將細胞以 3×10^5 個/mL 的密度接種至細胞培養皿中，第二天待細胞匯合度達到約 70% 即可使用。用含體積百分比為 0.25% 的 EDTA 的 Trypsin（Gibco，25200-072）消化細胞 2 min 後收集細胞，於常溫、100 g 離心細胞 5 min 棄上清後加入 1×DPBS（源培，B210）重懸細胞並計數，取 5×10^6 個細胞離心並收集，用 250 μ L Buffer R（Invitrogen，Neon™ Kit，PK10096）緩衝液重懸細胞，並向其中加入 25 μ g 目的質粒，用移液器輕輕混合均勻。後將懸液置入電轉儀（Invitrogen，Neon™ Transfection System，MP922947）進行電轉化，設置的反應條件為 1100 V / 20 ms / 2 次進行電轉。

1.2 細胞培養

【0175】 電轉化後，將所得到的細胞分別轉移至含有體積百分比為 10% FBS（Gibco，15140-141）且不含抗生素的 DMEM 培養基（Gibco，11995065）中，然後將細胞接種入 10 cm×10 cm 細胞培養皿中培養 48 h，接著以平均 0.5 個/孔的密度將細胞分裝至 96 孔細胞培養板中，加入終濃度為 2 μ g/mL 的嘌呤黴素（Gibco，A111138-03）作為篩選壓力，2 週左右觀察細胞株殖株生長情況，並挑取形成殖株的細胞株進行鑒定。

1.3 過表達細胞株的流式鑒定

【0176】 將上述 1.2 節獲得的細胞株，藉由流式細胞術進行鑒定，具體如下。

1.3.1 人CLDN18.2-HEK293T和鼠CLDN18.2-HEK293細胞株的流式鑒定

【0177】對於人CLDN18.2-HEK293T(康源博創, KC-0986)和鼠CLDN18.2-HEK293細胞株, 直接採用IMAB362抗體進行鑒定。

【0178】取 1×10^5 個細胞, 低速離心(300 g)去上清。將離心管底部的細胞藉由配製好的FACS緩衝液(含體積百分比為2%FBS的1×PBS緩衝液)潤洗一次, 然後向潤洗後的細胞中加入12.5 μg/mL抗體IMAB362, 在4 °C 孵育1 h, 接著再用上述FACS緩衝液潤洗三次, 加入PE標記的山羊抗人IgG Fc抗體(Abcam, ab98596) 0.5 μg, 在4 °C 孵育1 h。其後, 經FACS緩衝液潤洗三次, 並向細胞中加入200 μL FACS緩衝液重懸細胞, 最後藉由流式細胞儀(Beckman, CytoFLEX AOO-1-1102)進行檢測。

1.3.2 人CLDN18.1-HEK293和鼠CLDN18.1-HEK293細胞株的流式鑒定

【0179】由於IMAB362抗體只識別CLDN18.2而不識別CLDN18.1, 因此需要結合其它方法對人CLDN18.1-HEK293、鼠CLDN18.1-HEK293細胞株進行鑒定。考慮到人CLDN18.1和鼠CLDN18.1的序列一致性, 首先按細胞破膜試劑盒(eBioscience, 88-8824-00)的說明書方法對細胞進行固定和破膜, 然後根據抗CLDN18抗體[34H14L15]對C端CLDN18胞內段的識別結果及與IMAB362抗體的特異性結合結果進行流式細胞術鑒定。

【0180】具體方法如下: 取 1×10^5 個細胞, 低速離心(300 g), 去上清。將離心管底部的細胞用FACS緩衝液潤洗一次, 然後向潤洗後的細胞中加入200 μL IC固定液(eBioscience, 00-8222), 在4 °C 孵育1h, 接著用破膜緩衝液(eBioscience, 00-8333)潤洗兩次, 加入前述抗CLDN18抗體, 在4 °C 孵育1 h。再次用上述破膜緩衝液潤洗三遍之後, 加入Alexa Fluor® 488螢光標記的驢抗兔IgG H&L(abcam, ab150073) 0.5 μg, 在4 °C 孵育1 h, 最後藉由流式細胞儀(Beckman, CytoFLEX AOO-1-1102)進行檢測。

【0181】同時採用前述1.3.1的方法，用IMAB362抗體測定是否結合人CLDN18.1-HEK293和鼠CLDN18.1-HEK293細胞株。

【0182】流式鑒定的結果如圖1a所示。從圖1a中可以看出：抗CLDN18抗體可以識別人CLDN18.2-HEK293T、人CLDN18.1-HEK293、鼠CLDN18.2-HEK293、鼠CLDN18.1-HEK293、HEK293和HEK293T細胞；而抗體IMAB362僅識別鼠CLDN18.2-HEK293、人CLDN18.2-HEK293T，不識別鼠CLDN18.1-HEK293、人CLDN18.1-HEK293。這說明人CLDN18.2-HEK293T、人CLDN18.1-HEK293、鼠CLDN18.2-HEK293、鼠CLDN18.1-HEK293四個細胞株都成功地表達了對應的CLDN18蛋白。

2. 過表達腫瘤細胞株的建構與鑒定

【0183】對於過表達人CLDN18.2的胃癌細胞株KATOIII（人CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株）的建構則是採用慢病毒轉染的方式，並藉由抗體IMAB362進行鑒定。具體方法如下：

取狀態良好的人胃癌細胞KATOIII(ATCC® HTB-103™) 5×10^4 個，以30:1的MOI比例加入包裝好的含有人CLDN18.2序列（SEQ ID NO:15）的慢病毒，充分混勻，然後加入含有8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 聚凝胺（Polybrene，Sigma，107689）的IMDM完全培養基(Gibco，12440061)，混合均勻，於37℃、5% CO₂的恆溫培養箱中孵育20h後去除培養基，更換新鮮的IMDM完全培養基繼續孵育24 h，然後以平均0.5個細胞/孔的密度將轉染後的KATOIII細胞接種至96孔板中，並添加終濃度為2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤黴素進行抗性加壓篩選，於37℃、5% CO₂的恆溫培養箱中培養2-3週，並挑取殖株進行鑒定。

【0184】以上述1.3.1節同樣的方式，藉由抗體IMAB362對經抗性篩選的細胞株進行流式鑒定。

【0185】流式鑒定的結果如圖1b所示。從圖1b中可以看出，沒有轉染CLDN18.2的KATOIII細胞幾乎不被抗體IMAB362識別，說明此KATOIII細胞株上幾乎不表達CLDN18.2或者表達量極低；藉由慢病毒轉染而成功建構的人CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株能夠被抗體IMAB362識別，說明此細胞株建構成功。

實施例2

動物免疫和血清免疫效價檢測

1. 免疫接種

【0186】在本實施例中，採用的是羊駝免疫。具體操作如下：免疫原採用細胞株人CLDN18.2-HEK293T（康源博創，KC-0986）和含人CLDN18.2 ECD1（SEQ ID NO: 19）的hCLDN18.2-pLVX-puro質粒。分別用 2×10^7 個人CLDN18.2-HEK293T細胞（皮下多點注射）和2 mg質粒（肌肉多點注射）按週交替免疫羊駝（南昌大佳生物飼養），羊駝代號為NSY002，總計免疫8次。最後，用 2×10^7 個人CLDN18.2-HEK293T細胞進行加免。

2. 血清免疫效價測定

【0187】免疫效價測定是藉由ELISA方法根據免疫血清在抗原重組蛋白CLDN18.2（金斯瑞，CP0007）上的信號進行測定。具體方法如下。

【0188】在免疫效價測定的前一天，將抗原重組蛋白CLDN18.2用PBS稀釋到1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，獲得稀釋液。將30 μL 稀釋液加入到Elisa板中，於4 $^{\circ}\text{C}$ 包被過夜。在免疫效價測定當日，包被板用PBS潤洗兩遍，然後用含有體積百分比為5%脫脂奶粉的PBST室溫封閉兩小時，再用PBS潤洗兩遍。在另外一塊96孔稀釋板上將未經免疫的陰性血清和免疫後血清用PBS進行稀釋，首孔1000倍稀釋，然後後續7個孔採用2倍梯度稀釋。稀釋好的血清對應加入到包被了抗原重組蛋白CLDN18.2的第一塊Elisa板中，37 $^{\circ}$ 孵育1 h，PBS洗兩

遍後以1:5000加入二抗MonoRab™ 兔抗駱駝科VHH 抗體（金斯瑞，A01862-200），最後藉由酶標儀（Molecular Devices，SpecterMax 190）在450 nm波長下讀取OD值。結果如表1所示，羊駝免疫效價大致在1：8000左右。

表1

血清稀釋比例	OD 值	
	陰性羊駝血清	免疫羊駝 NSY002 血清
1:1000	0.045	0.5618
1:2000	0.0457	0.2796
1:4000	0.0452	0.1471
1:8000	0.0458	0.1028
1:16000	0.0454	0.0694
1:32000	0.0459	0.0616
1:64000	0.045	0.0574
1:128000	0.0453	0.0501

實施例3

羊駝免疫庫建構和篩選

【0189】動物免疫結束之後，將羊駝采血80 mL，藉由Ficoll-Paque密度梯度分離液（GE，17144003S）分離PBMC用於羊駝免疫庫建構。具體方法如下：

取Ficoll-Paque密度梯度分離液15 mL緩緩加入至50mL離心管中，然後緩緩加入15 mL採集的羊駝血液，使得兩種液體保持清晰的分離介面。在15°C左右以下述條件進行離心：400 g，20 min，加速度為3，減速為0。離心之後，整個液面分為四層，上層為血漿混合物，下層為紅細胞和粒細胞，中層為Ficoll-Paque液體，在上、中層交界處有以PBMC為主的白色雲霧層狹窄帶，即PBMC細胞層。先用無菌巴氏吸管小心地吸去上層的血漿混合物，然後

再用新的無菌巴氏吸管吸取PBMC，獲得分離的PBMC。用PBS潤洗兩遍，4 °C，1500 rpm水準離心10 min，最後用1.5 mL PBS 重懸，藉由細胞計數儀（CountStar，CountStar Altair）計數。

【0190】將分離的PBMC抽取其RNA，並藉由反轉錄試劑盒（TaKaRa，6210A）反轉錄成cDNA。由於羊駝抗體的分子形式不同於普通抗體，其不含有輕鏈而且重鏈不含有CH1，因此在VH germline基因前端和CH2上藉由設計引物，PCR得到兩個不同大小的片段，藉由割膠回收較小的目的片段；藉由比對VHH 抗體所有V基因和J基因的所有序列，設計含有NcoI和NotI酶切位點的簡並引物，然後以回收的DNA片段產物為範本擴增所有的VHH基因，最後藉由雙酶切和連接將目的抗體基因片段插入至噬菌體展示用載體上，其中VHH在C端融合了GIII基因。連接產物藉由回收試劑盒（Omega，D6492-02）回收，最後藉由電轉儀（Bio-Rad，MicroPulser）轉化至感受態大腸桿菌SS320（Lucigen, MC1061 F）中，並塗佈於具有氨苄抗性的2-YT固體平板（由胰蛋白胨1.5%，酵母提取物1%，NaCl 0.5%，瓊脂1.5%，按品質體積g/mL配製而成）。為了計算庫容，以1 μL菌液稀釋後在平板上形成的殖株來計算所有電轉化形成的總殖株數，即庫容容量。此免疫庫的庫容為 1×10^9 cfu。

【0191】基於庫容容量，挑取50個OD（1個OD為 5×10^8 cfu）的羊駝庫菌加入到新鮮的2-YT液體培養基中，使得初始OD值為0.05。置於37 °C，220 rpm培養至對數生長期，此時以5倍於細菌數的數量加入VSCM13輔助噬菌體，充分混勻，靜置30 min，然後在220 rpm條件下培養1 h，藉由10000 rpm離心5 min後，棄上清，置換至C+/K+ 2-YT培養基中，並於30 °C，220 rpm培養過夜。次日，13000 g離心10 min，其上清藉由加入20% PEG/NaCl（由

體積濃度為 20%的PEG6000和2.5 M NaCl配製而成)，沉澱得到羊駝庫對應的噬菌體，經PBS潤洗一次之後，用於噬菌體篩選。

【0192】 採用細胞篩選的方法，以人CLDN18.2-HEK293T細胞株作為篩選抗原，從噬菌體展示庫中篩選針對人CLDN18.2的抗體，具體方法如下所述。在 T25 培養方瓶中培養人 CLDN18.2-HEK293T 或者人 CLDN18.1-HEK293。當生長至90%左右密度時，此時生長狀態最佳，去除培養上清，並用PBS（源培，B310KJ）潤洗一次，然後加入5 mL 4%多聚甲醛（生工，E672002-0500）進行固定1 h，最後用PBS潤洗兩次，便可作為抗原材料用於噬菌體的細胞篩選。篩選時，羊駝庫對應的噬菌體首先和固定的人CLDN18.1-HEK293細胞培養方瓶室溫孵育1 h，然後吸取經過吸附後的上清噬菌體，和固定的人CLDN18.2-HEK293T細胞培養方瓶孵育2 h。PBS 潤洗兩次後，加入 3 mL 甘氨酸-HCl（pH2.0）輕輕混勻10 min，以洗脫特異性結合目的膜蛋白CLDN18.2的噬菌體，接著將洗脫上清侵染對數期的SS320菌體（Lucigen，60512-1），靜置30min，然後220 rpm條件下培養1 h，再藉由加入VSCM13輔助噬菌體，靜置30 min，繼續在220 rpm條件下培養1 h，離心並置換至C⁺/K⁺ 2-YT培養基中，最終得到的噬菌體繼續用於第二輪的篩選。如此反復，並對每輪隨機挑選的10個殖株進行序列分析，結果發現經過3輪的篩選，第三輪篩選後序列富集明顯。

【0193】 挑取第三輪篩選的殖株於96孔板中製備噬菌體上清，藉由噬菌體ELISA篩選針對CLDN18.2重組蛋白的陽性殖株，然後挑取所有陽性殖株測序分析，接著將序列唯一的殖株製備噬菌體上清進一步在流式水準上驗證，篩選到只結合人CLDN18.2而不結合人CLDN18.1的候選抗體。

【0194】 具體流式水準驗證方法如下：

首先分別取 1×10^5 個人CLDN18.2-HEK293T與人CLDN18.1-HEK293細胞，500 g低速離心去上清，細胞用如1.3.1所述的FACS緩衝液潤洗後，加入用10% FBS (Gibco, 15140-141) 封閉1 h的噬菌體製備上清，在4 °C 孵育1 h，然後用FACS緩衝液潤洗兩次，以1 : 50加入抗M13鼠源單殖株抗體(Sino Biological, 11973-MM05T)，並在4 °C 孵育1 h。然後用FACS緩衝液潤洗兩次，加入APC標記的抗鼠Fc二抗(Jackson, 115136071)，在4 °C 孵育1 h，以FACS緩衝液潤洗兩次，最後藉由流式細胞儀 (Beckman , CytoFLEX AOO-1-1102) 進行檢測。

【0195】具體結果如下表2所示：

表2

殖株號	噬菌體在 hCLDN18.1-HEK293T 細胞上結合的平均螢光 強度	噬菌體在 hCLDN18.2-HEK293 細 胞上結合的平均螢光強 度	噬 菌 體 在 hCLDN18.2-HEK293 和 hCLDN18.1-HEK293T 細胞上結合的平均螢光 強度的比值
A-2-4	4328	592000	137
A18-1-50	6041	403000	67
A18-1-70	6231	402000	65
A18-1-64	3496	406000	116
A18-1-78	3683	385000	105
A18-1-48	3453	357000	103
A293-82	4321	442000	102
A18-1-75	3891	387000	99
A18-1-6	1972	396000	201

A18-1-44	3739	390000	104
A18-1-62	2941	372000	126
A18-1-45	4753	369000	78
A-2-3	3255	570000	175
A18-1-63	175	385000	2200
A18-1-65	5894	428000	73
A18-1-42	1010	396000	392
A293-55	3344	392000	117
A293-34	2434	454000	187

【0196】以上結果表明，本揭露的抗體均能夠特異性結合人CLDN18.2。

【0197】分別以殖株號對相應的候選抗體進行命名。各候選抗體的氨基酸序列如下表3和4所示。

表3 本揭露的部分示例性抗體（候選抗體）的CDR序列

候選 抗體	CDR1		CDR2		CDR3	
	SEQ ID NO.	序列	SEQ ID NO.	序列	SEQ ID NO.	序列
A-2-4	1	GNIFRIDT	2	ISRGGTT	3	NAQAWDPGTFRYLEV
A18-1-50	1	GNIFRIDT	2	ISRGGTT	3	NAQAWDPGTFRYLEV
A18-1-70	1	GNIFRIDT	2	ISRGGTT	3	NAQAWDPGTFRYLEV
A18-1-64	1	GNIFRIDT	4	ISRGGST	5	NAQAWDPGTIRYLEV
A18-1-78	1	GNIFRIDT	4	ISRGGST	5	NAQAWDPGTIRYLEV
A18-1-48	1	GNIFRIDT	4	ISRGGST	5	NAQAWDPGTIRYLEV
A293-82	1	GNIFRIDT	2	ISRGGTT	6	NAQAWDVG TIRYLEV
A18-1-75	1	GNIFRIDT	2	ISRGGTT	6	NAQAWDVG TIRYLEV

A18-1-6	30	GSIFNIPV	31	ISTGGTT	37	NVLVISGIGSHLEV
A18-1-44	33	GSIFNLPV	31	ISTGGTT	37	NVLVISGIGSHLEV
A18-1-62	34	GTIFNIPV	31	ISTGGTT	37	NVLVISGIGSHLEV
A18-1-45	35	GIIFNIPV	31	ISTGGTT	62	NVLVVSGIGSHLEV
A-2-3	33	GSIFNLPV	31	ISTGGTT	62	NVLVVSGIGSHLEV
A18-1-63	30	GSIFNIPV	31	ISTGGTT	32	NVLVVSGIGSTLEV
A18-1-65	36	GTIFNLPV	31	ISTGGTT	62	NVLVVSGIGSHLEV
A18-1-42	38	GSILHIPV	31	ISTGGTT	62	NVLVVSGIGSHLEV
A293-55	39	GSIFHIVV	41	MSTGGTT	37	NVLVISGIGSHLEV
A293-34	40	GTFNIPV	31	ISTGGTT	37	NVLVISGIGSHLEV

表4本揭露的部分示例性抗體（候選抗體）的可變區序列

候選抗體	可變區	
	氨基酸序列	核苷酸序列
A-2-4	EVQVQESGGGLVQAGTSLRLSCAASGNIFRIDTMGWYRQAPG KQRELVAGISRGGTTTYAHSVKERFTISRDNKNTMYLQMNS LKSEDTAGYYCNAQAWDPGTFRYLEVWGGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 7)	SEQ ID NO: 22
A18-1-50	EVQVQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNIFRIDTMGWYRQAPG KQRELVAGISRGGTTTYAHSVKERFTISRDNKNTMYLQMNS LKSEDTAGYYCNAQAWDPGTFRYLEVWGGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 8)	SEQ ID NO: 24
A18-1-70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNIFRIDTMGWYRQAPG KQRELVAGISRGGTTTYAHSVKERFTISRDNKNTMYLQMNS LKSEDTAGYYCNAQAWDPGTFRYLEVWGGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 9)	SEQ ID NO: 26
A18-1-64	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNIFRIDTMGWYRQAPG	SEQ ID

	KQREFVAGISRGGSTNYAHSVKERFTISRDN AKNTMYLQMNS LKSEDTAGYYCNAQAWDPGTIRYLEVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10)	NO: 25
A18-1-78	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGNIFRIDTMGWYRQAPG KQREFVAGISRGGSTNYAHSVKERFTISRDN AKNTMYLQMNS LKSEDTAGYYCNAQAWDPGTIRYLEVWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 11)	SEQ ID NO: 28
A18-1-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGNIFRIDTMGWYRQAPG KQREFVAGISRGGSTNYAHSVKERFTISRDN AKNTMYLQMNS LKSEDTAGYYCNAQAWDPGTIRYLEVWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 12)	SEQ ID NO: 23
A293-82	EVQVVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGNIFRIDTMVWYRQAPG KQRELVAGISRGGTTNYAHSV KGRFTISRDN AKNTMYLQMNS LKSEDTATYYCNAQAWDVGTIRYLEVWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 13)	SEQ ID NO: 29
A18-1-75	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGNIFRIDTMVWYRQAPG KQRELVAGISRGGTTNYAHSV KGRFTISRDN AKNTMYLQMNS LKSEDTATYYCNAQAWDVGTIRYLEVWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 14)	SEQ ID NO: 27
A18-1-6	EVQVQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGSIFNIPVMSWYRQAPG KQRELVAGISTGGTTNYGDSVKGRFTISRDN AKTTVYLQMNS LKPEDTAVYYCNVLVISGIGSHLEVWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 42)	SEQ ID NO: 56
A18-1-44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGSIFNLPVMSWYRQAPG KQRELVAGISTGGTTNYGDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCNVLVISGIGSHLEVWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 43)	SEQ ID NO: 54
A18-1-62	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGTIFNIPVMGWYRQAPG KQRELVAGISTGGTTNYGDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCNVLVISGIGSHLEVWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 44)	SEQ ID NO: 57
A18-1-45	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGIIFNIPVMSWYRQAPGK	SEQ ID

	QRELVAGISTGGTTNYGDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSL KPEDTAVYYCNVLVVSGIGSHLEVWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 45)	NO: 55
A-2-3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFNLPVMSWYRQAPG KQRELVAGISTGGTTNYGDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LKPEDTAVYYCNVLVVSGIGSHLEVWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 46)	SEQ ID NO: 52
A18-1-63	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFNIPVMGWYRQAPG KQRELVAGISTGGTTNYGDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LKPEDTAVYYCNVLVVSGIGSTLEVWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 47)	SEQ ID NO: 58
A18-1-65	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTIFNLPVMSWYRQAPG KQRELVAGISTGGTTNYGDSVKGRFTISRDNARNTVYLMNS LKPEDTAVYYCNVLVVSGIGSHLEVWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 48)	SEQ ID NO: 59
A18-1-42	EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILHIPVMSWYRQAPG KQRELVAGISTGGTTNYGDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LKPEDTAAYYCNVLVVSGIGSHLEVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 49)	SEQ ID NO: 53
A293-55	QVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGSIFHIVVMGWYRQAPG KQRELVAGMSTGGTTNYGDSVKGRFTISRDNKNTVYLMN SLKPEDTAVYYCNVLVISGIGSHLEVWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 50)	SEQ ID NO: 61
A293-34	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFNIPVMGWYRQAPG KQRELVAGISTGGTTNYGDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LKPEDTAVYYCNVLVISGIGSHLEVWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 51)	SEQ ID NO: 60

【0198】對篩選到的多個候選抗體之間的氨基酸序列進行比較，其結果如圖2所示。

【0199】各候選抗體之間的可變區氨基酸序列同一性比較如下表5-1和5-2所示。

表5-1

抗體相似度	A18-1-48	A293-82	A-2-4	A18-1-70	A18-1-64	A18-1-78	A18-1-75	A18-1-50
A18-1-48	100%	98%	97%	92%	93%	91%	93%	95%
A293-82		100%	99%	94%	95%	93%	95%	95%
A-2-4			100%	93%	94%	94%	95%	95%
A18-1-70				100%	99%	92%	94%	93%
A18-1-64					100%	91%	93%	94%
A18-1-78						100%	98%	95%
A18-1-75							100%	97%
A18-1-50								100%

表5-2

抗體相似度	A18-1-65	A-2-3	A293-34	A18-1-63	A293-55	A18-1-45	A18-1-44	A18-1-6	A18-1-62	A18-1-42
A18-1-65	100%	91%	91%	93%	89%	91%	93%	93%	92%	91%
A-2-3		100%	97%	96%	96%	95%	95%	96%	94%	89%
A293-34			100%	96%	94%	94%	94%	94%	92%	88%
A18-1-63				100%	96%	94%	96%	94%	94%	89%
A293-55					100%	94%	94%	94%	94%	88%
A18-1-45						100%	98%	96%	90%	89%
A18-1-44							100%	96%	92%	91%
A18-1-6								100%	92%	92%
A18-1-62									100%	90%
A18-1-42										100%

實施例4

嵌合VHH-Fc(hIgG1)抗體的產生和表達

【0200】CLDN18.2在胃癌等癌症細胞上高表達，針對此類腫瘤相關靶點的抗體藥物可以藉由補體依賴的細胞毒性作用（CDC）和抗體依賴的細胞介導的細胞毒性作用（ADCC）來殺傷腫瘤。本實施例在實施例3篩選到的候選奈米抗體基礎上設計嵌合抗體，並進行表達用於後續的CDC和ADCC實驗。考慮到靶點的特殊性，在將候選奈米抗體基因建構到瞬轉表達質粒pcDNA3.4(Thermofisher, A14697)上時，在候選奈米抗體的C端融合人IgG1 Fc 片段（EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK，SEQ ID NO: 20），這個片段包括連接區和IgG1的恆定區，用以介導ADCC和CDC等效應。本實施例選取了候選奈米抗體A-2-4，在其基礎上融合了人IgG1 Fc片段，得到嵌合抗體NA1-S（在本揭露中也稱為“候選抗體NA1-S”、“抗體NA1-S”或“NA1-S抗體”），選取了候選奈米抗體A18-1-63、A18-1-42和A293-34，在各自基礎上融合了人IgG1 Fc片段，分別得到嵌合抗體NA3-S（在本揭露中也稱為“候選抗體NA3-S”、“抗體NA3-S”或“NA3-S抗體”，其為候選奈米抗體A18-1-63與人IgG1 Fc融合得到的嵌合抗體）、NA5-S（在本揭露中也稱為“候選抗體NA5-S”、“抗體NA5-S”或“NA5-S抗體”，其為候選奈米抗體A18-1-42與人IgG1 Fc融合得到的嵌合抗體）和NA6-S（在本揭露中也稱為“候選抗體NA6-S”、“抗體NA6-S”或“NA6-S抗體”，其為候選奈米抗體A293-34與人IgG1 Fc融合得到的嵌合抗體）。

【0201】抗體NA1-S、NA3-S、NA5-S和NA6-S的表達採用的是ExpiCHO瞬轉表達系統（Gibco，A29133），具體方法如下：

轉染當天，確認細胞密度為 7×10^6 至 1×10^7 個活細胞/mL左右，細胞活率 $>98\%$ ，此時用 37°C 預熱的新鮮ExpiCHO表達培養基25 mL將細胞調整到終濃度為 6×10^6 個細胞/mL，用 4°C 預冷的OptiPRO™SFM 1 mL稀釋目的質粒（共 $25\mu\text{g}$ ），同時用 $920\ \mu\text{L}$ OptiPRO™SFM稀釋 $80\ \mu\text{L}$ ExpiFectamine™CHO，再將兩者混合並輕輕吹打混勻製備成ExpiFectamine™CHO/質粒DNA混合液，室溫孵育1-5 min之後轉移到準備好的細胞懸液中，緩慢加入並同時輕輕搖晃細胞懸液，最後置於細胞培養搖床中，在 37°C ， $8\% \text{CO}_2$ 條件下培養。

【0202】在轉染後18-22個小時內添加ExpiCHO™Enhancer和ExpiCHO™Feed，搖瓶放置於 32°C 搖床和 $5\% \text{CO}_2$ 條件下繼續培養，在轉染後第五天，添加相同體積的ExpiCHO™Feed，緩慢加入的同時輕輕混勻細胞混懸液，轉染12-15天後，將細胞表達上清高速離心（ $15000\ \text{g}$ ， $10\ \text{min}$ ），所得上清用Protein A (Millipore，P2545)進行親和純化，然後用 $100\ \text{mM}$ 乙酸钠（ $\text{pH}3.0$ ）洗脫目的蛋白，接著用 $1\ \text{M}$ Tris-HCl中和，最後所得蛋白（即抗體NA1-S、NA3-S、NA5-S或NA6-S）用濃縮管（Millipore，UFC901096）的方法置換至PBS緩衝液當中。

實施例5

候選抗體的特異性結合和物種交叉特異性結合測定

【0203】以候選抗體NA1-S為例，用含 0.25% EDTA的Trypsin（Gibco，25200-072）消化生長狀態良好的人CLDN18.2-HEK293T、HEK293T、HEK293、人CLDN18.1-HEK293、鼠CLDN18.2-HEK293和鼠CLDN18.1-HEK293細胞，取 1×10^5 個細胞和 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 候選抗體NA1-S孵育1

h，另外以hIgG1同型抗體作為對照。用FACS緩衝液潤洗兩次，然後和0.5 μ g PE標記的山羊抗人IgG-Fc二抗（Abcam，ab98596）在4 $^{\circ}$ C 孵育1 h。其後，用FACS緩衝液洗三次，藉由流式細胞儀（Beckman，CytoFLEX AOO-1-1102）檢測候選抗體在細胞上的結合。採用與NA1-S相同的方法測定候選抗體NA3-S、NA5-S和NA6-S的特異性結合及物種交叉特異性。

【0204】流式檢測的結果（如圖3所示）顯示，類似於對照抗體IMAB362，候選抗體NA1-S（圖3a）、NA3-S、NA5-S和NA6-S（圖3b）均特異性結合人CLDN18.2-HEK293T和鼠CLDN18.2-HEK293，而在HEK293T、HEK293、人CLDN18.1-HEK293和鼠CLDN18.1HEK293細胞上不結合。這說明候選抗體NA1-S、NA3-S、NA5-S和NA6-S能夠特異性結合CLDN18.2而不結合CLDN18.1，而且在人和鼠CLDN18.2上交叉識別。

實施例6

候選抗體在人CLDN18.2-HEK293T細胞株和人CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株上結合能力的比較

【0205】取培養狀態良好的人CLDN18.2-HEK293T細胞，與三倍梯度稀釋後的候選抗體NA1-S、NA3-S、NA5-S和NA6-S分別在4 $^{\circ}$ C 孵育1 h。經FACS緩衝液潤洗兩遍，然後加入PE標記的山羊抗人IgG-Fc抗體（Abcam，ab98596）0.5 μ g，在4 $^{\circ}$ C 孵育1 h，再經FACS緩衝液潤洗兩遍之後，藉由流式細胞儀檢測。

【0206】流式檢測結果如圖4a、圖5a和圖5b所示，結果顯示：在人CLDN18.2-HEK293T細胞上，候選抗體均表現出來和對照抗體相當的細胞結合活性。

【0207】採用相同的方法測定候選抗體NA1-S、NA3-S、NA5-S和NA6-S在人CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株上的結合能力。流式檢測結果如圖4b和圖

5c所示，結果顯示：在人CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞株上，候選抗體均表現出來和對照抗體相當的細胞結合活性。

實施例7

候選抗體的補體依賴的細胞毒性作用（CDC）

【0208】採用MTS法測定候選抗體的CDC細胞殺傷效應。候選抗體NA1-S、NA3-S、NA5-S和NA6-S由於包含有IgG1 Fc片段，可以藉由CDC對細胞進行殺傷，而MTS試劑能夠被活細胞產生的NADPH或者NADH還原成一種有色化合物，因此顏色的深淺代表了抗體介導CDC的殺傷效果。具體操作方法如下：

以候選抗體NA1-S為例。先經trypsin消化培養狀態良好的人CLDN18.2-HEK293T細胞之後，取 5×10^4 個細胞和稀釋5倍的兔血清混合，然後分別加入梯度稀釋的候選抗體NA1-S或對照抗體IMAB362各50 μ L，於37 $^{\circ}$ C孵育3 h。然後，向候選抗體NA1-S或對照抗體IMAB362中分別加入MTS試劑（Promega，G3580）30 μ L，充分混合均勻，置於37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的恆溫培養箱培養4 h，期間觀察培養基顏色變化，藉由酶標儀測定492 nm波長下的OD值。其中以10% Triton X-100加靶細胞作為全裂解的對照，以只加靶細胞作為空白陰性對照，以免補體加靶細胞作為背景陰性對照。

【0209】細胞殺傷率按如下公式計算：細胞殺傷率（%）=（候選抗體孔OD值 - 背景孔OD值）/（全裂解孔OD值 - 空白孔OD值） \times 100%。

【0210】候選抗體NA1-S在人CLDN18.2-HEK293T腫瘤細胞上的CDC殺傷效應結果如圖6a所示。從圖6a中可以看出，相對於對照抗體IMAB362，候選抗體NA1-S在等摩爾濃度下展示出更強的CDC細胞殺傷效應，NA1-S的EC50為0.5289 nM，而IMAB362的EC50為0.936 nM。採用同樣的方法測定候選抗體NA3-S、NA5-S和NA6-S在人CLDN18.2-HEK293T細胞上的CDC

殺傷效應，其結果如圖7a至圖7c所示。從圖7a至圖7c中可以看出，相對於對照抗體IMAB362，候選抗體NA3-S、NA5-S和NA6-S在等摩爾濃度下也展示出相當的CDC細胞殺傷效果。

【0211】採用同樣的方法測定候選抗體NA1-S在人CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞上的CDC殺傷效應，其結果如圖6b所示。從圖6b中可以看出，NA1-S在等摩爾濃度下展示出比對照抗體IMAB362更強的CDC細胞殺傷效應，其中NA1-S的EC50為1.91 nM，而IMAB362的EC50為50.86 nM。採用與NA1-S相同的方法測定候選抗體NA3-S、NA5-S和NA6-S的CDC效應，與NA1-S類似，它們也有相比對照抗體IMAB362更強的CDC細胞殺傷效應。例如NA3-S在等摩爾濃度下展示出比對照抗體IMAB362更強的CDC細胞殺傷效應，其中奈米抗體NA3-S的EC50為4.831 nM，而IMAB362的EC50為85.83 nM（圖7d）。

實施例8

抗體依賴的細胞介導的細胞毒作用(ADCC)

【0212】利用乳酸脫氫酶（LDH）釋放法檢測ADCC效應。其原理是：抗體的可變區結合靶細胞上的目標抗原，當抗體的Fc段與PBMC中的NK效應細胞上的FcRIIIa（又名CD16a）結合後，NK細胞會釋放穿孔素、顆粒酶等裂解靶細胞，然後藉由LDH乳酸脫氫酶試劑盒（Takara，MK401）可以檢測細胞上清中乳酸脫氫酶的釋放，以此來測定NK細胞對靶細胞的殺傷程度。具體操作如下：

在96孔細胞培養板中每孔加入50 μ L 密度為 2×10^5 個/mL的人CLDN18.2-HEK293T細胞，置於37 $^{\circ}$ C 培養箱中培養過夜（16-20 h）。加入梯度稀釋的候選抗體NA1-S或NA3-S 50 μ L，混勻後於37 $^{\circ}$ C 培養箱孵育20 min，再加入復甦好的 5×10^5 個/孔的人PBMC細胞（效應細胞/靶細胞比例

為50:1)，37 °C 培養箱孵育4 h 後，藉由300 g離心得到上清，然後加入LDH 檢測試劑，反應60 min，最後藉由酶標儀(Molecular Devices, SpectraMax190) 測定在492 nm波長下的OD值並進行檢測結果的分析。其中以10% Triton X-100加靶細胞作為全裂解的對照，以只加靶細胞作為空白陰性對照，以 PBMC加靶細胞作為背景陰性對照。

【0213】細胞殺傷率按如下公式計算：殺傷率(%) = (候選抗體孔OD值-背景孔OD值) / (全裂解孔OD值 - 空白孔OD值) ×100%

【0214】結果(圖8a和圖8c)顯示，候選抗體NA1-S和NA3-S在等摩爾濃度下均具有和對照抗體IMAB362相當的細胞殺傷活性。

【0215】採用同樣的方法測定候選抗體 NA1-S 或 NA3-S 在人 CLDN18.2-KATOIII腫瘤細胞上的ADCC殺傷效應，結果如圖8b和圖8d所示。圖8b的結果顯示，NA1-S在等摩爾濃度下展示出比對照抗體IMAB362更強的ADCC細胞殺傷效應，其中，候選抗體的殺傷效率高達45%，而IMAB362對照抗體的殺傷效率只有17%。圖8d的結果顯示，NA3-S在等摩爾濃度下也展示出比對照抗體IMAB362更強的ADCC細胞殺傷效應，其中，候選抗體的殺傷效率近50%，而IMAB362對照抗體的殺傷效率只有20-25%。

實施例9

體內抑瘤實驗(以人CLDN18.2-HEK293T作為成瘤細胞株)

【0216】實驗使用6-8週齡，雌性SCID小鼠(體重24-26 g)。實驗小鼠飼養在恆溫恆濕的獨立通風盒內，飼養室溫度21-24 °C，濕度30-53%。

【0217】將 1×10^7 個人CLDN18.2-HEK293T細胞進行右側腋窩皮下接種注射。待皮下瘤塊體積達80-100 mm³時，剔除腫瘤體積差異較大的小鼠樣本，

依據腫瘤體積進行隨機分組(每組8只小鼠):分別是PBS處理組,IMAB362抗體處理組,候選抗體NA1-S處理組。細胞接種6天後即開始用抗體處理(候選抗體NA1-S根據分子量採用與IMAB362抗體等摩爾濃度的劑量,換算成品質濃度分別為2.5 mg/kg和5 mg/kg),每個星期兩次給藥處理,分別是靜脈注射和腹膜內注射兩種方式交替給藥。隨時觀察和記錄腫瘤長(mm)和寬(mm),計算其腫瘤生長體積(V),計算方式為: $V = (\text{長} \times \text{寬}^2) / 2$ 。以同樣的方法對候選抗體NA3-S進行測試,其中候選抗體NA3-S根據分子量採用與IMAB362抗體等摩爾濃度的劑量,換算成品質濃度分別為5 mg/kg和10 mg/kg。

【0218】抗體抑瘤的結果如圖9a至圖9b所示,從中可以看出:相對於對照抗體IMAB362,候選抗體NA1-S在此品質劑量下在低濃度的抑制腫瘤生長方面的效果與高濃度的對照抗體相似,腫瘤生長抑制率為55%左右。候選抗體NA3-S在低品質濃度劑量下在抑制腫瘤生長方面的效果與高濃度對照抗體相似,幾乎都可以完成抑制腫瘤的生長。

實施例10

候選抗體在人CLDN18.2上的結合表位測定

【0219】候選抗體和對照抗體IMAB362都特異性結合CLDN18.2而不結合CLDN18.1,而CLDN18.2和CLDN18.1的膜外區域只有在ECD1區域有8個氨基酸的差別,因此推測候選抗體和對照抗體IMAB362的抗原結合表位元在ECD1區域上,為了確認候選抗體和IMAB362的抗原結合位置是否一致,本實施例採用了競爭結合的方法,具體方法如下:

將傳代2-4次且生長狀態良好的CLDN18.2-HEK293T細胞用於實驗,4°C、300 g離心去除上清,隨後將細胞用FACS緩衝液重懸,計數後將細胞密度

調整為 2×10^6 個細胞/mL，以每孔100 μ L加至新的96孔圓底板中，4°C、300 g離心並去除上清。

【0220】以候選抗體NA1-S為例，配製FACS緩衝液（1X PBS+2% FBS）並使用FACS緩衝液將競爭抗體NA1-S（或IMAB362）進行梯度稀釋，同樣使用FACS緩衝液將生物素標記的IMAB362（或者NA1-S）蛋白稀釋至13.4 nM，分別向96孔板中加入100 μ L梯度稀釋液和100 μ L生物素標記蛋白稀釋液，用排槍輕輕吹打混勻並將96孔板放置於4°C 孵育1 h。將孵育後的抗體和細胞混合液於4°C、300 g離心並去除上清，隨後向對應孔中各加入200 μ L的 FACS緩衝液並重懸細胞，4°C、300 g離心去上清；重複此步驟2次。使用FACS緩衝液將PE標記的鏈黴親和素（eBioscience, 12-4317-87）以1:200進行稀釋，使用排槍向對應細胞中加入200 μ L/孔並輕輕吹打重懸細胞，隨後將細胞放置於4°C 避光孵育30 min，孵育結束後將細胞於4°C、300 g離心去除上清，加入FACS緩衝液重懸細胞，重複該步驟兩次。最後藉由流式細胞儀(Beckman, CytoFLEX AOO-1-1102)檢測。

【0221】流式結果如圖10a顯示，隨著NA1-S濃度的增加，IMAB362-biotin在CLDN18.2-HEK293T細胞上的結合減少，同樣在如圖10c中的流式結果顯示隨著IMAB362濃度的增加，NA1-S-biotin在CLDN18.2-HEK293T細胞上的結合減少，這些都說明NA1-S和IMAB362在 CLDN18.2上的抗原表位類似。NA3-S的結果如圖10b和圖10d顯示，其與NA1-S相似。

【0222】為了進一步瞭解NA1-S或NA3-S和IMAB362在CLDN18.2上的關鍵氨基酸位點，基於CLDN18.2和CLDN18.1在ECD1存在8個氨基酸差別，本實施例建構了8個突變體HEK293T細胞株，將CLDN18.2上的8個差別氨基酸分別突變成對應CLDN18.1的氨基酸，然後藉由測定待測抗體在野生株和突

變株上的結合能力差別判斷此氨基酸是否為抗體結合的關鍵氨基酸。具體方法如下：

首先，測定CLDN18.2野生和突變體HEK293T細胞株的表達情況，方法如1.3.2的方法，按細胞破膜試劑盒（eBioscience，88-8824-00）的說明書方法對細胞進行固定和破膜，然後根據抗CLDN18抗體[34H14L15]對C端CLDN18胞內段的結合能力判定表達情況，結果如圖10e，各個突變細胞株以及野生株的CLDN18.2都有較高的表達。

【0223】基於此，參考1.3.1的方法，測定候選抗體NA1-S或NA3-S和IMAB362在CLDN18.2野生和突變體HEK293T細胞株上的結合強度，同時將候選抗體的結合強度除以各個細胞株的表達水準，並以候選抗體在野生株的結合作為100%進行歸一化處理作為最終的相對結合強度，如圖10f至圖10i，CLDN18.2ECD1上的3個位點分別是Q29、Q47和E56對於NA1-S和NA3-S在人CLDN18.2-HEK293T的結合非常關鍵，而A42、E56和G65是IMAB362結合CLDN18.2的3個關鍵氨基酸。

實施例11

候選抗體介導的Fab-ZAP細胞殺傷效應

【0224】CLDN18.2在多種腫瘤上都高表達，而且在正常組織中其特異性的表達在胃上皮細胞的緊密連接結構中，因此有可能成為理想的ADC藥物靶點。本實驗藉由抗體介導Fab-ZAP內吞的細胞毒性來檢測抗體的內吞活性，其中Fab-ZAP (Atsbio, IT-51-100)是一種連接了saporin（皂素）的抗Fc區域的Fab片段，saporin是一種核糖體抑制劑，能夠抑制蛋白質的合成而使細胞死亡。Fab-ZAP和CLDN18.2的抗體孵育後使CLDN18.2的抗體帶上Fab-ZAP，當CLDN18.2的抗體內吞時，Fab-ZAP隨著抗體進入到細胞內，

從而殺死細胞，然後藉由MTS(Promega, G3580)檢測細胞的活性來檢測並比較候選抗體和對照抗體的內吞活性。具體方法如下：

取處於對數生長期的CLDN18.2-HEK293T細胞，用胰酶（0.25% (w/v) Trypsin 0.53 mM EDTA）消化細胞至細胞間不黏連，產生間隙，用完全培養基終止消化。充分混勻細胞後，細胞計數並測定其活率。將細胞密度調整為 4×10^4 細胞/mL，以每孔50 μ L 加至細胞培養板並置於37°C細胞培養箱孵育16小時。同時用DMEM完全培養基稀釋Fab-ZAP至2 μ g/mL，以此為稀釋液進一步將候選抗體NA1-S或NA3-S和對照抗體進行梯度稀釋，並用排槍取50 μ L加入至細胞培養板中與CLDN18.2-HEK293T輕輕吹打混勻，將細胞培養板放入37°C細胞培養箱繼續孵育72小時。接著使用排槍向每孔中加入20 μ L MTS並輕輕吹打混勻，37°C孵育2-4小時，最後將細胞板用臺式離心機以1000rpm的轉速離心5分鐘後，於酶標儀（Molecular Devices, SpectraMax190）中讀取資料，檢測波長為492nm。

【0225】結果如圖11a至圖11b，相對於對照抗體IMAB362，候選抗體NA1-S和NA3-S可以更有效的藉由Fab-ZAP對目標細胞CLDN18.2-HEK293T進行殺傷，NA1-S和IMAB362的IC50分別為0.1nM和0.24nM，NA3-S和IMAB362的IC50分別為0.07 nM和0.32nM。這不僅充分說明了候選抗體可以藉由CLDN18.2進入細胞，而且較佳於對照抗體IMAB362，有潛力用於開發ADC抗體偶聯藥物。

實施例12

候選抗體NA3-S的人源化改造

【0226】相對鼠源抗體，羊駝來源奈米抗體和人源抗體的同源性較高，但其結構特殊，因此在NA3-S人源化設計過程中，選擇了最接近人的種系基

因germline，而且在做回復突變時兼顧抗體的結構維持不變，最終設計了一系列人源化抗體，其中NA3S-H1為最佳的分子，其抗體序列見下表。

CDR1		CDR2		CDR3	
SEQ ID NO.	序列	SEQ ID NO.	序列	SEQ ID NO.	序列
30	GSIFNIPV	31	ISTGGTT	32	NVLVVSGIGSTLEV

【0227】可變區序列（SEQ ID NO: 63）：

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFNIPVMGWYRQAPGKQRELV
AGISTGGTTNYGDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCN
VLVVSGIGSTLEVWGQGTLLTVSS

其中斜體加粗的V（第5位）和S（最後一位）是人源化位點。編碼該可變區序列的核苷酸序列如SEQ ID NO: 64所示。

【0228】為了觀察NA3-S人源化後親和力是否不下降，採用了1.3.1所述方法比較NA3-S和NA3S-H1在CLDN18.2-HEK293T細胞上的結合能力，結果如圖12，人源化的分子NA3S-H1和母本抗體NA3-S具備相似的親和力，且較佳於對照抗體IMAB362。

實施例13

候選抗體NA3S-H1在高濃度下的結合特異性

【0229】CLDN18.2和CLDN18.1的候選抗體結合區域ECD1上只存在8個氨基酸的差別，而後者表達於肺部上皮細胞中，因此抗體藥物如果非特異性結合CLDN18.1將導致嚴重的肺部損傷或者毒性從而限制臨床的應用，因此本實施例在體外採用不同濃度的抗體（包括100 μg/mL高濃度）和CLDN18.1-HEK293孵育，方法如1.3.1所述，將不同濃度的抗體和目標細胞

CLDN18.1-HEK293在4 °C 孵育1 h，接著再用上述FACS緩衝液潤洗三次，加入PE標記的山羊抗人IgG Fc抗體 (Abcam, ab98596) 0.5 µg (0.5mg/ml)，在4 °C 孵育1 h。其後，經FACS緩衝液潤洗三次，並向細胞中加入200 µL FACS緩衝液重懸細胞，最後藉由流式細胞儀 (Beckman, CytoFLEX AOO-1-1102) 進行檢測，記錄結合強度和細胞結合陽性率。

【0230】結果如圖13a顯示，在結合強度方面，NA3S-H1和對照抗體IMAB362在CLDN18.1-HEK293的結合不隨著濃度的增加而增加，與同種型對照的結合強度幾乎一致，而在圖13b的細胞結合陽性率方面，即使在100 µg/mL高濃度下，NA3S-H1和IMAB362的陽性率都非常微弱在0.04-0.18%之間，其中NA3S-H1三次重複的陽性率為0.145%、0.17%和0.173%，IMAB362三次重複的陽性率為0.042%、0.128%和0.041%，同種型對照hIgG1三次重複的陽性率為0.063%、0.233%和0.115%。綜合圖13a和圖13b的結果，NA3S-H1和對照抗體IMAB362都不結合CLDN18.1-HEK293細胞，都能夠特異性結合CLDN18.2而不結合CLDN18.1。

實施例14

候選抗體NA3S-H1的補體依賴的細胞毒性作用 (CDC)

【0231】本實施例比較人源化分子NA3S-H1和對照抗體IMAB362的補體依賴的細胞毒性作用，參考實施例7的方法進行測定，簡單來講，取 5×10^4 個CLDN18.2-KATOIII細胞和稀釋5倍的兔血清混合，然後分別加入梯度稀釋的候選抗體NA3S-H1或對照抗體IMAB362 各50 µL，於37 °C 孵育3 h。接著加入MTS試劑 (Promega, G3580) 30 µL，充分混合均勻，置於37 °C、5% CO₂的恆溫培養箱培養4 h，期間觀察培養基顏色變化，最後藉由酶標儀測定492 nm波長下的OD值，其中以10% Triton X-100加靶細胞作為全裂解的

對照，以只加靶細胞作為空白陰性對照，以免補體加靶細胞作為背景陰性對照，用以推算抗體的細胞殺傷效果。

【0232】結果如圖14，NA3S-H1比對照抗體IMAB362具有更強的CDC細胞殺傷效應，其中NA3S-H1的EC50為10.41 nM，而IMAB362的EC50為149.4 nM。

實施例15

人源化抗體NA3S-H1介導NK細胞的細胞毒作用(ADCC)

【0233】本實施例比較了人源化抗體NA3S-H1和對照抗體介導的細胞毒作用，方法採用實施例8的方法，藉由將梯度稀釋的候選抗體與固定比例的靶細胞以及人PBMC細胞孵育4 h後，採用LDH乳酸脫氫酶試劑盒（Takara，MK401）方法並在492 nm波長下檢測細胞上清中乳酸脫氫酶的釋放，以此來測定抗體介導NK細胞對靶細胞的殺傷效果。

【0234】圖15a和圖15b顯示了抗體介導NK細胞對CLDN18.2-KATOIII或者CLDN18.2-HEK293T的細胞殺傷效果，結果表明候選抗體NA3S-H1和對照抗體IMAB362介導的ADCC效應相近。

【0235】本領域技術人員將進一步認識到，在不脫離其精神或中心特徵的情況下，本發明可以以其他具體形式來實施。由於本發明的前述描述僅揭露了其示例性實施方案，應該理解的是，其他變化被認為是在本發明的範圍內。因此，本發明不限於在此詳細描述的特定實施方案。相反，應當參考所附申請專利範圍來指示本發明的範圍和內容。

【符號說明】

【0236】

ADCC：抗體依賴的細胞介導的細胞毒性作用

CDC：補體依賴的細胞毒性作用

CDR：互補決定區

NA1-S、NA3-S、NA5-S、NA6-S：候選抗體

NA3S-H1：人源化分子

PBS：磷酸鹽緩衝鹽水

序列表

<110> 三優生物醫藥（上海）有限公司

<120> 新型CLDN18.2結合分子

<130> IEC196041-TW

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Gly Asn Ile Phe Arg Ile Asp Thr
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr
1 5

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Asn Ala Gln Ala Trp Asp Pro Gly Thr Phe Arg Tyr Leu Glu Val
1 5 10 15

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Ile Ser Arg Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Asn Ala Gln Ala Trp Asp Pro Gly Thr Ile Arg Tyr Leu Glu Val
1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

Asn Ala Gln Ala Trp Asp Val Gly Thr Ile Arg Tyr Leu Glu Val
1 5 10 15

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Glu Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Thr
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn Ile Phe Arg Ile Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr Thr Tyr Ala His Ser Val Lys
50 55 60

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 9

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn Ile Phe Arg Ile Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr Thr Tyr Ala His Ser Val Lys
50 55 60

Glu Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Gly Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Ala Gln Ala Trp Asp Pro Gly Thr Phe Arg Tyr Leu Glu Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn Ile Phe Arg Ile Asp
 20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Ser Arg Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala His Ser Val Lys
 50 55 60

Glu Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Gly Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

Ala Gln Ala Trp Asp Pro Gly Thr Ile Arg Tyr Leu Glu Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 11

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn Ile Phe Arg Ile Asp
 20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Ser Arg Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala His Ser Val Lys
 50 55 60

Glu Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Gly Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

Ala Gln Ala Trp Asp Pro Gly Thr Ile Arg Tyr Leu Glu Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 12
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn Ile Phe Arg Ile Asp
 20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Ser Arg Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala His Ser Val Lys
 50 55 60

Glu Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Gly Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Ala Gln Ala Trp Asp Pro Gly Thr Ile Arg Tyr Leu Glu Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 13

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 13

Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn Ile Phe Arg Ile Asp
20 25 30

Thr Met Val Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala His Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Ala Gln Ala Trp Asp Val Gly Thr Ile Arg Tyr Leu Glu Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 14
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn Ile Phe Arg Ile Asp
 20 25 30

Thr Met Val Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala His Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

Ala Gln Ala Trp Asp Val Gly Thr Ile Arg Tyr Leu Glu Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 15
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 15

Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
 1 5 10 15

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
 20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
 35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50 55 60

Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
 85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
 100 105 110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
 115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
 130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
 145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
 165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
 180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
 195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
 210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
 225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
 245 250 255

Lys His Asp Tyr Val
 260

<210> 16

<211> 261

<212> PRT

<213> 人

<400> 16

Met Ser Thr Thr Thr Cys Gln Val Val Ala Phe Leu Leu Ser Ile Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr
 20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser Val Phe Gln Tyr Glu Gly
 35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50 55 60

Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
 85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
 100 105 110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
 115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
 130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
 145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
 165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
 180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
 195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
 210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
 225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
 245 250 255

Lys His Asp Tyr Val
 260

<210> 17
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 17

Met Ser Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
 1 5 10 15

Gly Phe Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
 20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
 35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50 55 60

Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Val Ile Gly Ile Leu Val
 85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Asp Asp Ser
 100 105 110

Ala Lys Ala Lys Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Leu Phe Ile Ile Ser
 115 120 125

Gly Ile Cys Ala Ile Ile Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
 130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Ser Gly Met Gly Gly
 145 150 155 160

Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala
 165 170 175

Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly
 180 185 190

Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Thr Pro Asp Asp Ser Asn
 195 200 205

Phe Lys Ala Val Ser Tyr His Ala Ser Gly Gln Asn Val Ala Tyr Arg
 210 215 220

Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Arg Asn
 225 230 235 240

Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Asp Glu Gln Ser
 245 250 255

His Pro Thr Lys Tyr Asp Tyr Val
 260

<210> 18
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 18

Met Ala Thr Thr Thr Cys Gln Val Val Gly Leu Leu Leu Ser Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr
 20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Gln Tyr Glu Gly
 35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Gln Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50 55 60

Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Val Ile Gly Ile Leu Val
 85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Asp Asp Ser
 100 105 110

Ala Lys Ala Lys Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Leu Phe Ile Ile Ser
 115 120 125

Gly Ile Cys Ala Ile Ile Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
 130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Ser Gly Met Gly Gly
 145 150 155 160

Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala
 165 170 175

Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly
 180 185 190

Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Thr Pro Asp Asp Ser Asn
 195 200 205

Phe Lys Ala Val Ser Tyr His Ala Ser Gly Gln Asn Val Ala Tyr Arg
 210 215 220

Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Arg Asn
 225 230 235 240

Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Asp Glu Gln Ser
 245 250 255

His Pro Thr Lys Tyr Asp Tyr Val
 260

<210> 19

<211> 53

<212> PRT

<213> 人

<400> 19

Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val
 1 5 10 15

Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly
 20 25 30

Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met
 35 40 45

Leu Gln Ala Val Arg
 50

<210> 20

<211> 232

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115

120

125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 21
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 21

Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn
 1 5 10

<210> 22
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 22

gaggtgcagg tgcaggagtc tgggggaggg ctggtacagg ctgggacctc tctgagactc 60

tectgtgcag cctctggcaa catcttccgt atcgatacca tgggctggta ccgccaggct 120
ccaggaaagc agcgcgagtt ggtcgcaggt atttctcgtg gtggtacaac aacctatgca 180
cactccgtga aggaacgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac gatgtatctg 240
caaatgaaca gcctgaaate tgaggacacg gccggtatt attgtaatgc acaggcgtgg 300
gatcctggta catttcggta tctcgaagtt tggggccagg gcaccctggg cactgtctca 360

<210> 23
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 23
gaggtgcagt tggtaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggctc tctgagactc 60
tectgtgcag cctctggcaa catcttccgt atcgatacca tgggctggta ccgccaggct 120
ccaggaaagc agcgcgagtt cgtcgcaggt attagtcgtg gtggtagcac aaactatgca 180
cactccgtga aggaacgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac gatgtatctg 240
caaatgaaca gcctgaaate tgaggacacg gccggtatt attgtaatgc acaggcgtgg 300
gatcctggta caatccggta tctcgaagtt tggggccagg gcaccctggg cactgtctca 360

<210> 24
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 24
gaggtgcagg tgcaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggctc tctgagactc 60
tectgtgcag cctctggcaa catcttccgt atcgatacca tgggctggta ccgccaggct 120
ccaggaaagc agcgcgagtt ggtcgcaggt atttctcgtg gtggtacaac aacctatgca 180
cactccgtga aggaacgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac gatgtatctg 240
caaatgaaca gcctgaaate tgaggacacg gccggtatt attgtaatgc acaggcgtgg 300
gatcctggta catttcggta tctcgaagtt tggggccagg gcaccctggg cactgtctca 360

<210> 25

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 25

caggtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc tctgagactc 60

tctgtgcag cctctggcaa catcttccgt atcgatacca tgggctggta ccgccaggct 120

ccaggaaagc agcgcgagtt cgtcgcaggt attagtcgtg gtggtagcac aaactatgca 180

cactccgtga aggaacgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac gatgtatctg 240

caaatgaaca gcctgaaatc tgaggacacg gccggctatt attgtaatgc acaggcgtgg 300

gatcctggta caatccggta tctcgaagtt tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360

tca 363

<210> 26

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 26

caggtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc tctgagactc 60

tctgtgcag cctctggcaa catcttccgt atcgatacca tgggctggta ccgccaggct 120

ccaggaaagc agcgcgagtt ggtcgcaggt atttctcgtg gtggtacaac aacctatgca 180

cactccgtga aggaacgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac gatgtatctg 240

caaatgaaca gcctgaaatc tgaggacacg gccggctatt attgtaatgc acaggcgtgg 300

gatcctggta catttcggta tctcgaagtt tggggccagg gcaccctggt cactgtctca 360

<210> 27

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 27

gaggtgcagt tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc tctgagactc 60

tctgtgcag cctctggcaa catcttccgt atcgatacca tgggtgtggta ccgccaggct 120

ccaggaaagc agcgcgagtt ggtcgcaggt atttctcgtg gtggtaccac aaactatgca 180

cactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac gatgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgaaate tgaggacacg gccacgtatt attgtaatgc acaggcgtgg 300
 gatgttggtg caatccggta tctcgaagtt tggggccagg gcaccctggt cactgtctca 360

<210> 28
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 28
 gaggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc tctgagactc 60
 tectgtgcag cctctggcaa catcttccgt atcgatacca tgggctggta ccgccaggct 120
 ccaggaaagc agcgcgagtt cgtcgcaggt attagtcgtg gtggtagcac aaactatgca 180
 cactccgtga aggaacgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac gatgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgaaate tgaggacacg gccggtatt attgtaatgc acaggcgtgg 300
 gatcctggta caatccggta tctcgaagtt tggggccagg gcaccctggt cactgtctca 360

<210> 29
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 29
 gaggtgcagg tctgtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc tctgagactc 60
 tectgtgcag cctctggcaa catcttccgt atcgatacca tgggtgtggta ccgccaggct 120
 ccaggaaagc agcgcgagtt ggtcgcaggt atttctcgtg gtggtaccac aaactatgca 180
 cactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac gatgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgaaate tgaggacacg gccacgtatt attgtaatgc acaggcgtgg 300
 gatgttggtg caatccggta tctcgaagtt tggggccagg gcaccctggt cactgtctca 360

<210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 30

Gly Ser Ile Phe Asn Ile Pro Val
1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 31

Ile Ser Thr Gly Gly Thr Thr
1 5

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 32

Asn Val Leu Val Val Ser Gly Ile Gly Ser Thr Leu Glu Val
1 5 10

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 33

Gly Ser Ile Phe Asn Leu Pro Val
1 5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 34

Gly Thr Ile Phe Asn Ile Pro Val
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 35

Gly Ile Ile Phe Asn Ile Pro Val
1 5

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 36

Gly Thr Ile Phe Asn Leu Pro Val
1 5

<210> 37
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 37

Asn Val Leu Val Ile Ser Gly Ile Gly Ser His Leu Glu Val
1 5 10

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 38

Gly Ser Ile Leu His Ile Pro Val
1 5

<210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 39

Gly Ser Ile Phe His Ile Val Val
1 5

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 40

Gly Thr Phe Phe Asn Ile Pro Val
1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 41

Met Ser Thr Gly Gly Thr Thr
1 5

<210> 42

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 42

Glu Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Asn Ile Pro
20 25 30

Val Met Ser Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Val Leu Val Ile Ser Gly Ile Gly Ser His Leu Glu Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Asn Leu Pro
20 25 30

Val Met Ser Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Val Leu Val Ile Ser Gly Ile Gly Ser His Leu Glu Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 44
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 44

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Ile Phe Asn Ile Pro
20 25 30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Val Leu Val Ile Ser Gly Ile Gly Ser His Leu Glu Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 45
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 45

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ile Phe Asn Ile Pro
 20 25 30

Val Met Ser Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

Val Leu Val Val Ser Gly Ile Gly Ser His Leu Glu Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 46

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Asn Leu Pro
 20 25 30

Val Met Ser Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

35

40

45

Ala Gly Ile Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Val Leu Val Val Ser Gly Ile Gly Ser His Leu Glu Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 47

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 47

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Asn Ile Pro
20 25 30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

Val Leu Val Val Ser Gly Ile Gly Ser Thr Leu Glu Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 48

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 48

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Ile Phe Asn Leu Pro
 20 25 30

Val Met Ser Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

Val Leu Val Val Ser Gly Ile Gly Ser His Leu Glu Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 49
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 49

Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu His Ile Pro
 20 25 30

Val Met Ser Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

Val Leu Val Val Ser Gly Ile Gly Ser His Leu Glu Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 50
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 50

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe His Ile Val
20 25 30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Gly Met Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Val Leu Val Ile Ser Gly Ile Gly Ser His Leu Glu Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 51

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 51

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Phe Asn Ile Pro
20 25 30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys
50 55 60

caaatgaaca gcctgaaacc tgaagacacg gccgcttatt actgtaatgt cctggtagta 300

agtggatttg ggagccatct cgaagtttgg ggccagggca ccctggtcac cgtgtctca 360

<210> 54

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 54

gaggtgcagt tggaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ccggggggtc tctgagactc 60

tctgtgcag cctctggaag catcttcaat ctctctgtca tgagctggta ccgccaggct 120

ccaggggaagc agcgcgagtt ggtcgcagga attagtaccg gaggtactac aaactatgga 180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240

caaatgaaca gcctgaaacc tgaagacacg gccgtctatt actgtaatgt cctggtaata 300

agtggatttg ggagccatct cgaagtttgg ggccagggca ccctggtcac tgtctca 357

<210> 55

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 55

gaggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ccggggggtc tctgagactc 60

tctgtgcag cctctggaat catcttcaat atccctgtca tgagctggta ccgccaggct 120

ccaggggaagc agcgcgagtt ggtcgcaggt attagtaccg gtggtactac aaactatgga 180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240

caaatgaaca gcctgaaacc tgaagacacg gccgtctatt actgtaatgt cctggtagta 300

agtggatttg ggagccatct cgaagtttgg ggccagggca ccctggtcac tgtctca 357

<210> 56

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 56

gaggtgcagg tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ccgggggggtc tctgagactc 60
tctgtgcag cctctggaag catcttcaat atccctgtca tgagctggta ccgccaggct 120
ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcaggt attagtaccg gtggtactac aaactatgga 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaccac ggtgtatctg 240
caaatgaaca gcctgaaacc tgaagacacg gccgtctatt actgtaatgt cctggtaata 300
agtggatttg ggagccatct cgaagtttgg ggccagggca ccctggtcac tgtctca 357

<210> 57
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 57
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ccgggggggtc tctgagactc 60
tctgtgcag cctctggaac catcttcaat atccctgtca tgggctggta ccgccaggct 120
ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcaggt attagtactg gtggtactac aaactatgga 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240
cagatgaaca gcctgaaacc tgaagacacg gccgtctatt actgtaatgt cctggtaata 300
agtggatttg ggagccatct cgaagtttgg ggccagggca ccctggtcac tgtctca 357

<210> 58
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 58
caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ccgggggggtc tctgagactc 60
tctgtgcag cctctggaag catcttcaat atccctgtca tgggctggta ccgccaggct 120
ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcaggt attagtactg gtggtactac aaactatgga 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240
caaatgaaca gcctgaaacc tgaagacacg gccgtctatt actgtaatgt cctggtagta 300
agtggatttg ggagcactct cgaagtttgg ggccagggca ccctggtcac tgtctca 357

<210> 59
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 59
 gaggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ccggggggtc tctgagactc 60
 tectgtgcag cctctggaac catcttcaat ctccctgtca tgagctggta ccgccaggct 120
 ccaggaagc agcgcgagtt ggtcgcaggt attagtaccg gtggtactac aaattatgga 180
 gactccgtga agggacgatt caccatctcc agagacaacg ccaggaacac ggtgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaagacacg gccgtctatt actgtaatgt cctggtagta 300
 agtggtattg ggagccatct cgaagtttgg ggccagggca ccttggtcac tgtctca 357

<210> 60
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 60
 caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ccggggggtc tctgagactc 60
 tectgtgcag cctctggaac ctcttcaat atccctgtca tgggctggta ccgccaggct 120
 ccaggaagc agcgcgagtt ggtcgcaggt attagtaccg gtggtactac aaactatgga 180
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240
 cagatgaaca gcctgaaacc tgaagacacg gccgtctatt actgtaatgt cctggtaata 300
 agtggtattg ggagccatct cgaagtttgg ggccagggca ccttggtcac tgtctca 357

<210> 61
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 61
 caggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc tcggtgcagc ccggggggtc tctgagactc 60
 tectgtgcag cctctggaag catcttccat atcgttgtca tgggctggta ccgccaggct 120
 ccaggaagc agcgcgagtt ggtcgcaggt atgagtaccg gtggtactac aaactatgga 180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240

caaatgaaca gcctgaaacc tgaagacacg gccgtctact actgtaatgt cctggtaatt 300

agtggatttg ggagccatct cgaagtttgg ggccagggca ccttggtcac tgtctca 357

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 62

Asn Val Leu Val Val Ser Gly Ile Gly Ser His Leu Glu Val

1 5 10

<210> 63

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 63

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Asn Ile Pro

20 25 30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

35 40 45

Ala Gly Ile Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn

85 90 95

Val Leu Val Val Ser Gly Ile Gly Ser Thr Leu Glu Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 64

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 64

caggtgcagc tggaggagtc cggcggcgga ctggtgcagc ctggaggatc cctgcggctg 60

tectgcgctg ctageggcag catcttcaac atccccgtga tgggctggta caggcaggct 120

cccggcaagc agcgggagct ggtggctgga atcagcaccg gcggcaccac caactatggc 180

gacagcgtga agggcaggtt caccatcagc agggataacg ctaagaatac cgtgtacctg 240

cagatgaaca gcctgaagcc tgaggatacc gccgtgtact attgcaatgt gctgggtggtg 300

agcggcatcg gcagcacctt ggaggtgtgg ggccagggaa ccctggtgac agtgagctcc 360

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種CLDN18.2結合分子，其包含至少一個免疫球蛋白單可變結構域，其中該免疫球蛋白單可變結構域包含選自以下任一組的CDR1、CDR2和CDR3：

(a) 包含與SEQ ID NO：1至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列的CDR1，包含與SEQ ID NO：2至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列的CDR2，和包含與SEQ ID NO：3至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列的CDR3；和

(b) 包含與SEQ ID NO：30至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列的CDR1，包含與SEQ ID NO：31至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列的CDR2，和包含與SEQ ID NO：32至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列的CDR3。

【請求項2】 如請求項1所述的CLDN18.2結合分子，其中：

(a) CDR1在氨基酸序列上與SEQ ID NO：1存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，CDR2在氨基酸序列上與SEQ ID NO：2存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，和/或CDR3在氨基酸序列上與SEQ ID NO：3存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異；或

(b) CDR1在氨基酸序列上與SEQ ID NO：30存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，CDR2在氨基酸序列上與SEQ ID NO：31存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，和/或CDR3在氨基酸序列上與SEQ ID NO：32存在不超過2個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異。

【請求項3】 如請求項1所述的CLDN18.2結合分子，其中：

(a) CDR1在氨基酸序列上與SEQ ID NO：1存在1個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，CDR2在氨基酸序列上與SEQ ID NO：2存在1個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，和/或CDR3在氨基酸序列上與SEQ ID NO：3存在1個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異；或

(b) CDR1在氨基酸序列上與SEQ ID NO：30存在1個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，CDR2在氨基酸序列上與SEQ ID NO：31存在1個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異，和/或CDR3在氨基酸序列上與SEQ ID NO：32存在1個氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差異。

【請求項4】 如前述請求項中任一項所述的CLDN18.2結合分子，其中該CLDN18.2結合分子是針對CLDN18.2的抗體或其抗原結合片段。

【請求項5】 如前述如請求項中任一項所述的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域是VHH；例如，來自駱駝科動物(例如羊駝)的VHH。

【請求項6】 如前述請求項中任一項所述的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域包含選自以下任一組的CDR1、CDR2和CDR3：

(a) 如SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，如式ISRGGX₁T所示的氨基酸序列的CDR2，其中X₁為T或S，和如式NAQAWDX₂GTX₃RYLEV所示的氨基酸序列的CDR3，其中X₂為P或V，X₃為F或I；和

(b) 如SEQ ID NO：30、33、34、35、36、38、39或40所示的氨基酸序列的CDR1，如式X₄STGGTT所示的氨基酸序列的CDR2，其中X₄為I或M，和如式NVLVX₅SGIGSX₆LEV所示的氨基酸序列的CDR3，其中X₅為I或V，X₆為H或T。

【請求項7】 如前述請求項中任一項所述的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域包含：

(a)如SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：2所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：3所示的氨基酸序列的CDR3；

(b)如SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：4所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：5所示的氨基酸序列的CDR3；

(c)如SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：2所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：6所示的氨基酸序列的CDR3；

(d)如SEQ ID NO：30所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：32所示的氨基酸序列的CDR3；

(e)如SEQ ID NO：30所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；

(f)如SEQ ID NO：33所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；

(g)如SEQ ID NO：33所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；

(h)如SEQ ID NO：34所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；

(i)如SEQ ID NO：35所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；

(j)如SEQ ID NO：36所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；

(k)如SEQ ID NO：38所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：62所示的氨基酸序列的CDR3；

(l)如SEQ ID NO：39所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：41所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3；
或

(m)如SEQ ID NO：40所示的氨基酸序列的CDR1，如SEQ ID NO：31所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO：37所示的氨基酸序列的CDR3。

【請求項8】 如前述請求項中任一項所述的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域包含選自下組的任一種：

(a)SEQ ID NO：7的氨基酸序列，與SEQ ID NO：7至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列，或與SEQ ID NO：7相比具有一個或多個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列；和

(b) SEQ ID NO：47所示的氨基酸序列，與SEQ ID NO：47至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列，或與SEQ ID NO：47相比具有一個或多個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

【請求項9】 如前述請求項中任一項所述的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域為：

(a)在SEQ ID NO: 7的以下位點中的一個或多個發生修飾（例如，氨基酸的取代和/或添加）：第1、4、5、14、16、35、47、56、58、65、92、102、105或121位氨基酸；或

(b) 在SEQ ID NO: 47的以下位點中的一個或多個發生修飾（例如，氨基酸的取代和/或添加）：第1、4、5、11、27、28、29、30、31、32、35、51、75、76、92、100、106或120位氨基酸。

【請求項10】 如前述請求項中任一項所述的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域包含以下序列或由以下序列組成：SEQ ID NO: 7-14、SEQ ID NO: 42-51和63中的任一者。

【請求項11】 如前述請求項中任一項所述的CLDN18.2結合分子，其中該CLDN18.2結合分子是單結構域抗體，例如重鏈單結構域抗體；嵌合抗體；或人源化抗體。

【請求項12】 如前述請求項中任一項所述的CLDN18.2結合分子，其中該免疫球蛋白單可變結構域與另一分子融合，該另一分子是例如免疫球蛋白(例如IgG)的Fc結構域或螢光蛋白。

【請求項13】 如請求項12所述的CLDN18.2結合分子，其中該CLDN18.2結合分子是包含來自駱駝科動物的VHH與人IgG（例如，人IgG1或IgG4）的Fc結構域的嵌合抗體，或包含來自駱駝科動物的VHH經人源化後所得VHH與人IgG（例如，人IgG1或IgG4）的Fc結構域的人源化抗體。

【請求項14】 如請求項13所述的CLDN18.2結合分子，其中該CLDN18.2結合分子是包含來自羊駝的VHH與人IgG1的Fc結構域的嵌合抗體。

【請求項15】 如前述請求項中任一項所述的CLDN18.2結合分子，其中該CLDN18.2結合分子結合人CLDN18.2的胞外結構域1（ECD1）。

【請求項16】 一種CLDN18.2結合分子，其與如前述請求項中任一項所述的CLDN18.2結合分子競爭相同表位。

【請求項17】 如前述請求項中任一項所述的CLDN18.2結合分子，其特異性結合CLDN18.2，但不結合CLDN18.1。

【請求項18】 一種分離的核酸分子，其包含編碼如前述請求項中任一項所定義的CLDN18.2結合分子的核酸序列。

【請求項19】 如請求項18所述的分離的核酸分子，其包含以下序列或由以下序列組成：SEQ ID NO: 22-29、SEQ ID NO: 52-61和64中的任一者。

【請求項20】 一種表達載體，其包含如請求項18或請求項19所述的分離的核酸分子。

【請求項21】 一種宿主細胞，其包含如請求項20所述的表達載體。

【請求項22】 如請求項21所述的宿主細胞，該宿主細胞是細菌細胞(例如大腸桿菌 (*E. coli*))，真菌細胞(例如酵母)或哺乳動物細胞。

【請求項23】 一種藥物組合物，其包含至少一種如請求項1至請求項17中任一項所定義的CLDN18.2結合分子和藥學上可接受的載體。

【請求項24】 製備如請求項1至請求項17中任一項所定義的CLDN18.2結合分子的方法，包括以下步驟：

- 在如請求項21或請求項22所述的宿主細胞中表達如請求項1至請求項17中任一項所定義的CLDN18.2結合分子；和
- 從宿主細胞分離CLDN18.2結合分子。

【請求項25】 一種治療受試者中與CLDN18.2相關的病症的方法，該方法包括：向該受試者施用治療有效量的如請求項1至請求項17中任一項所定義的CLDN18.2結合分子。

【請求項26】 如請求項25所述的方法，其中該與CLDN18.2相關的病症包括涉及表達CLDN18.2的細胞的疾病或與表達CLDN18.2的細胞相關的疾病。

【請求項27】 如請求項25或請求項26所述的方法，其中該與CLDN18.2相關的病症包括一癌症。

【請求項28】 如請求項27所述的方法，其中該癌症包括骨癌、血癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳腺癌、前列腺癌、子宮癌、性器官和生殖器官癌、霍奇金氏病、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌症、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、膀胱癌、腎癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)腫瘤、神經外胚層癌症、脊柱軸腫瘤、膠質瘤、腦脊膜瘤和垂體腺瘤。

【請求項29】 如請求項28所述的方法，其中該癌症為胃癌。

【請求項30】 如請求項1至請求項17中任一項所定義的CLDN18.2結合分子在製備用於治療或預防與CLDN18.2相關的病症的藥物中的用途。

【請求項31】 用於治療或診斷與CLDN18.2相關的病症的試劑盒，其包含一容器，該容器包含如請求項1至請求項17中任一項所定義的CLDN18.2結合分子。

【發明圖式】

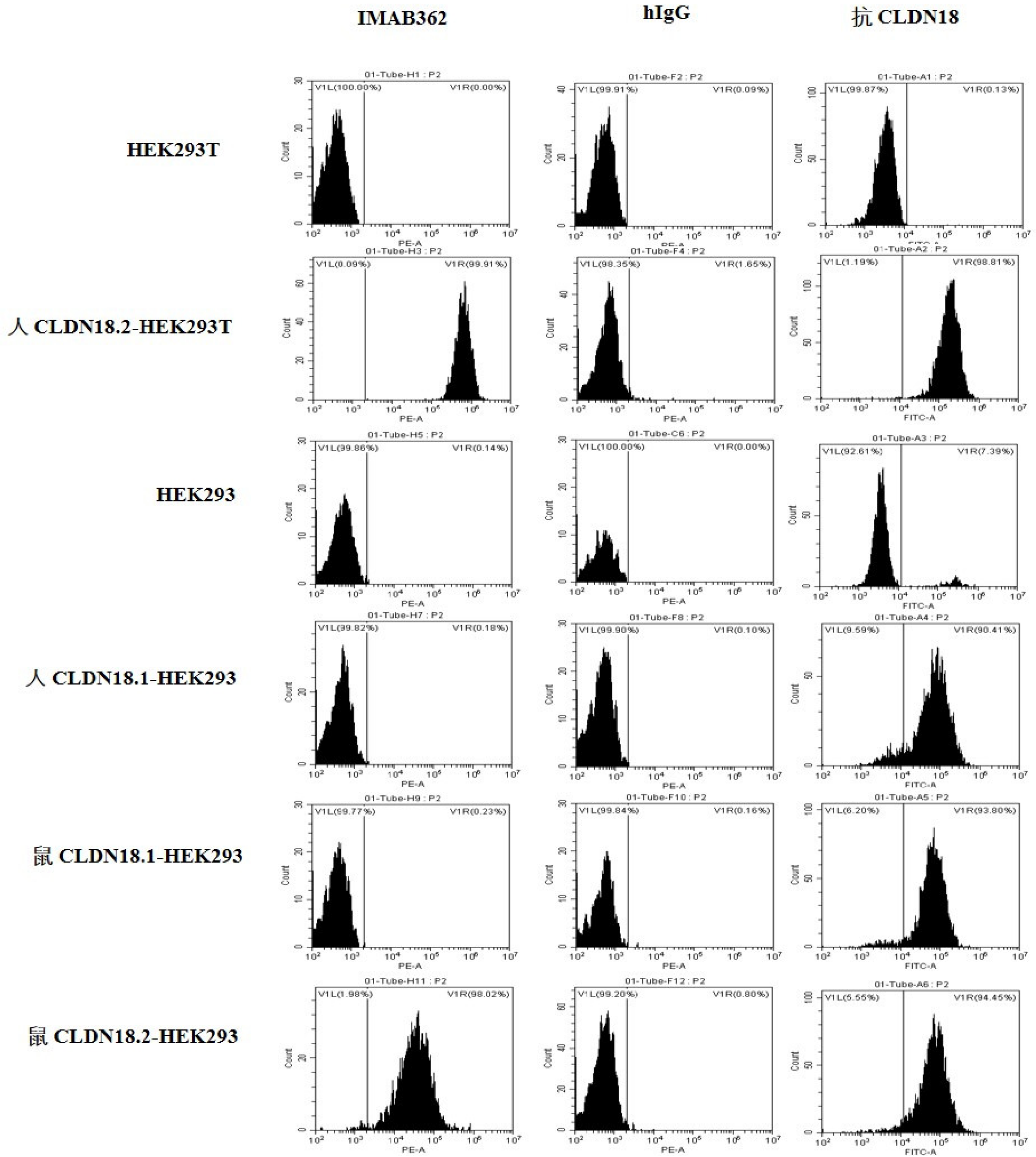


圖 1a

IMAB362

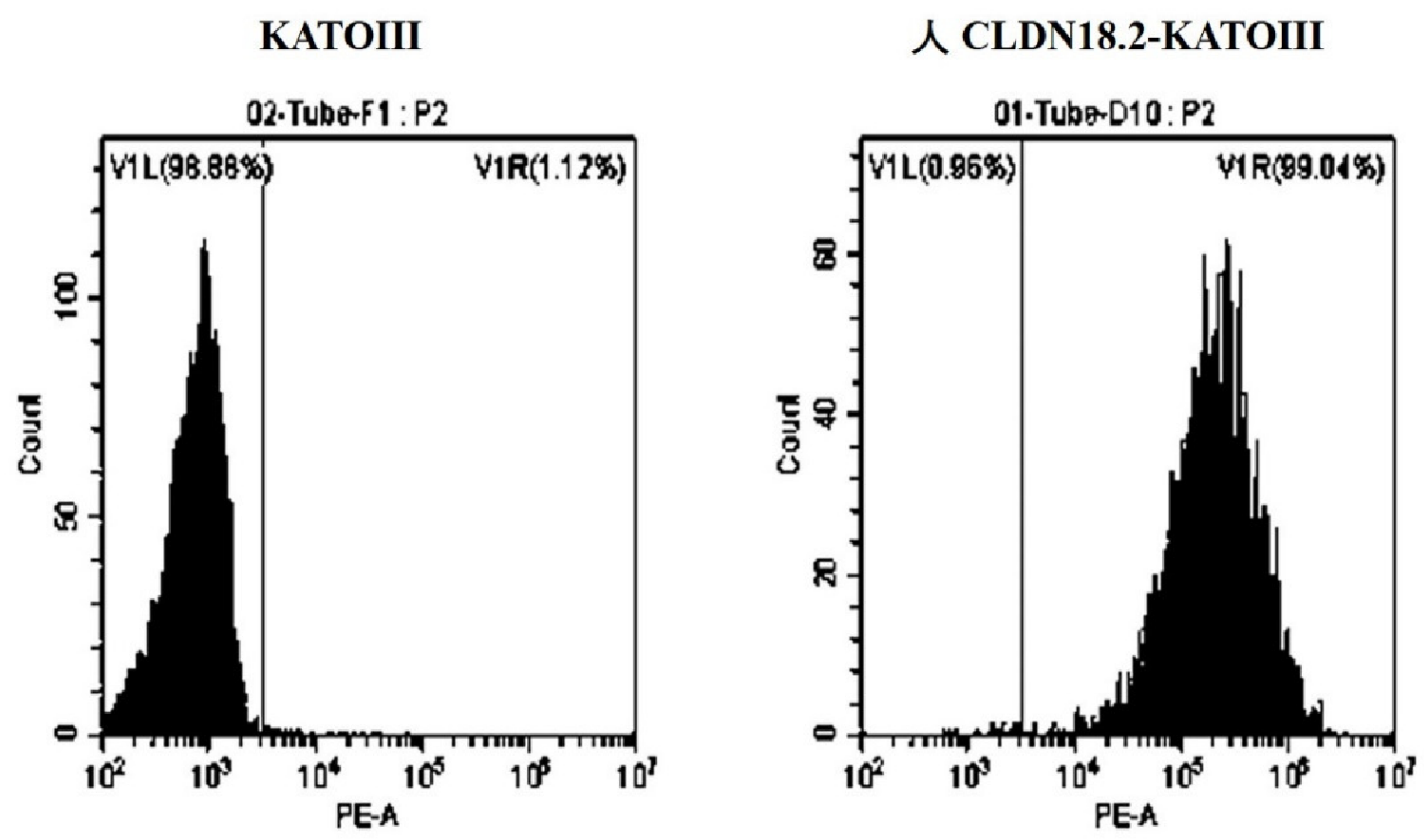


圖 1b

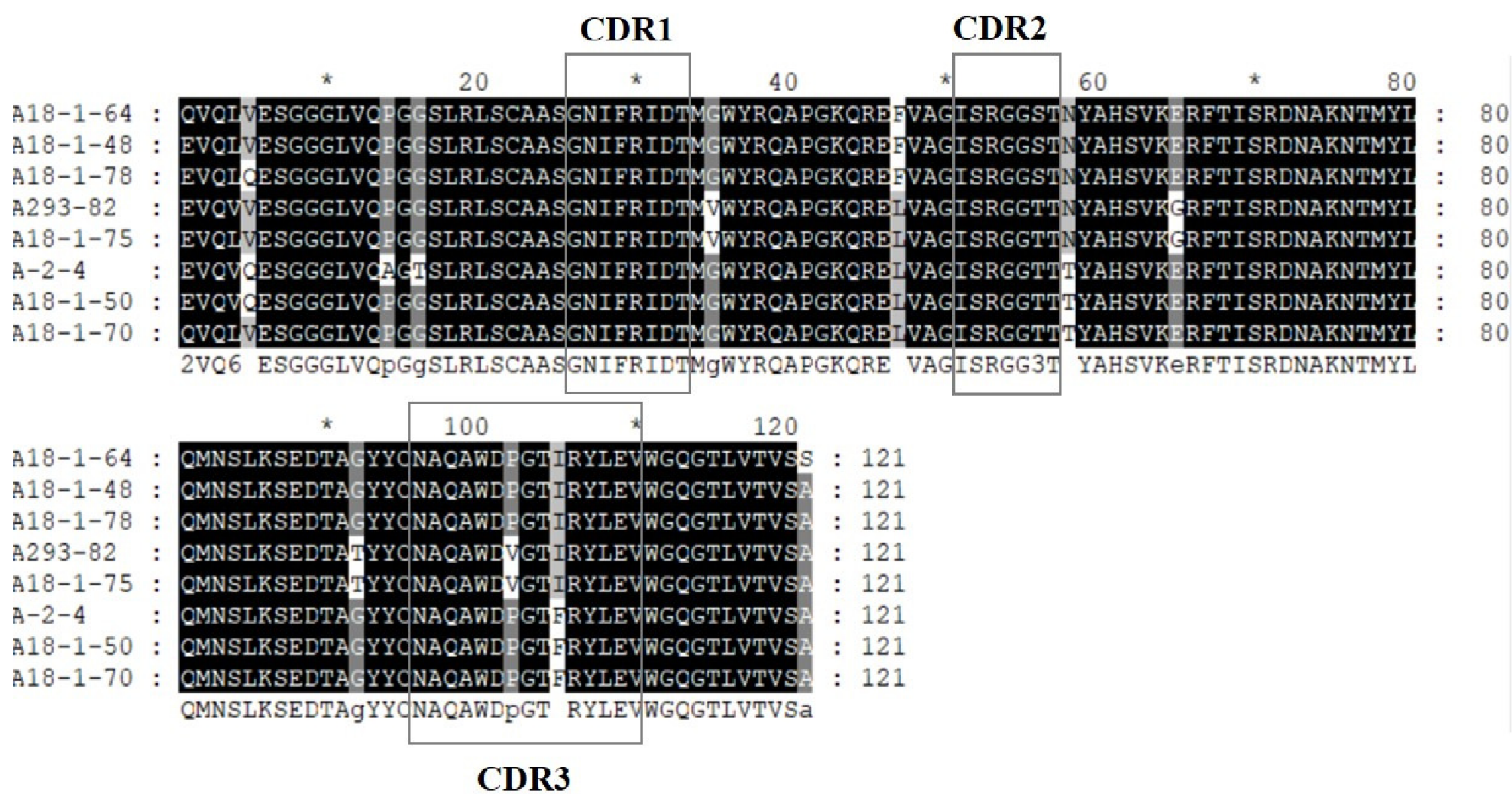


圖 2a

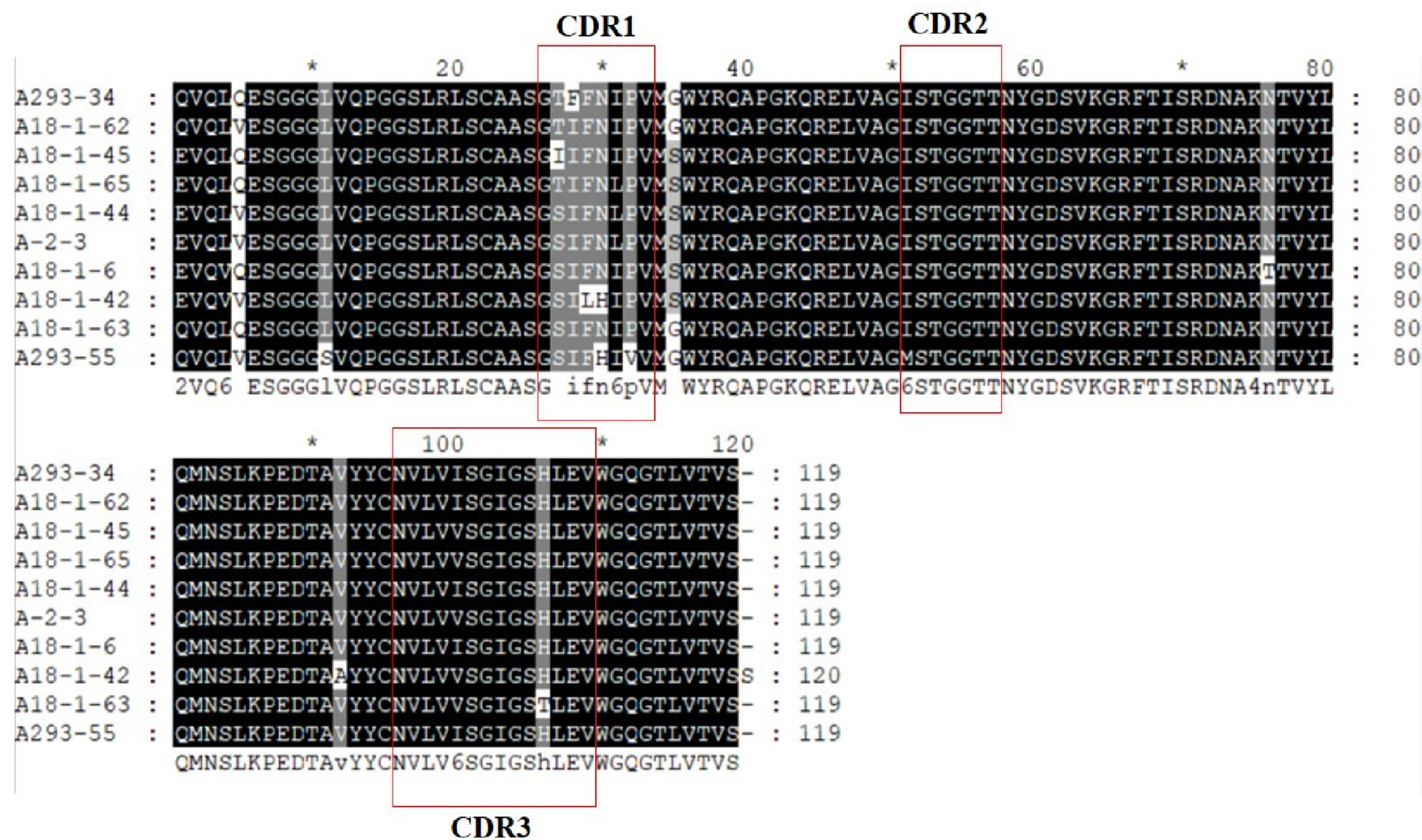


圖 2b

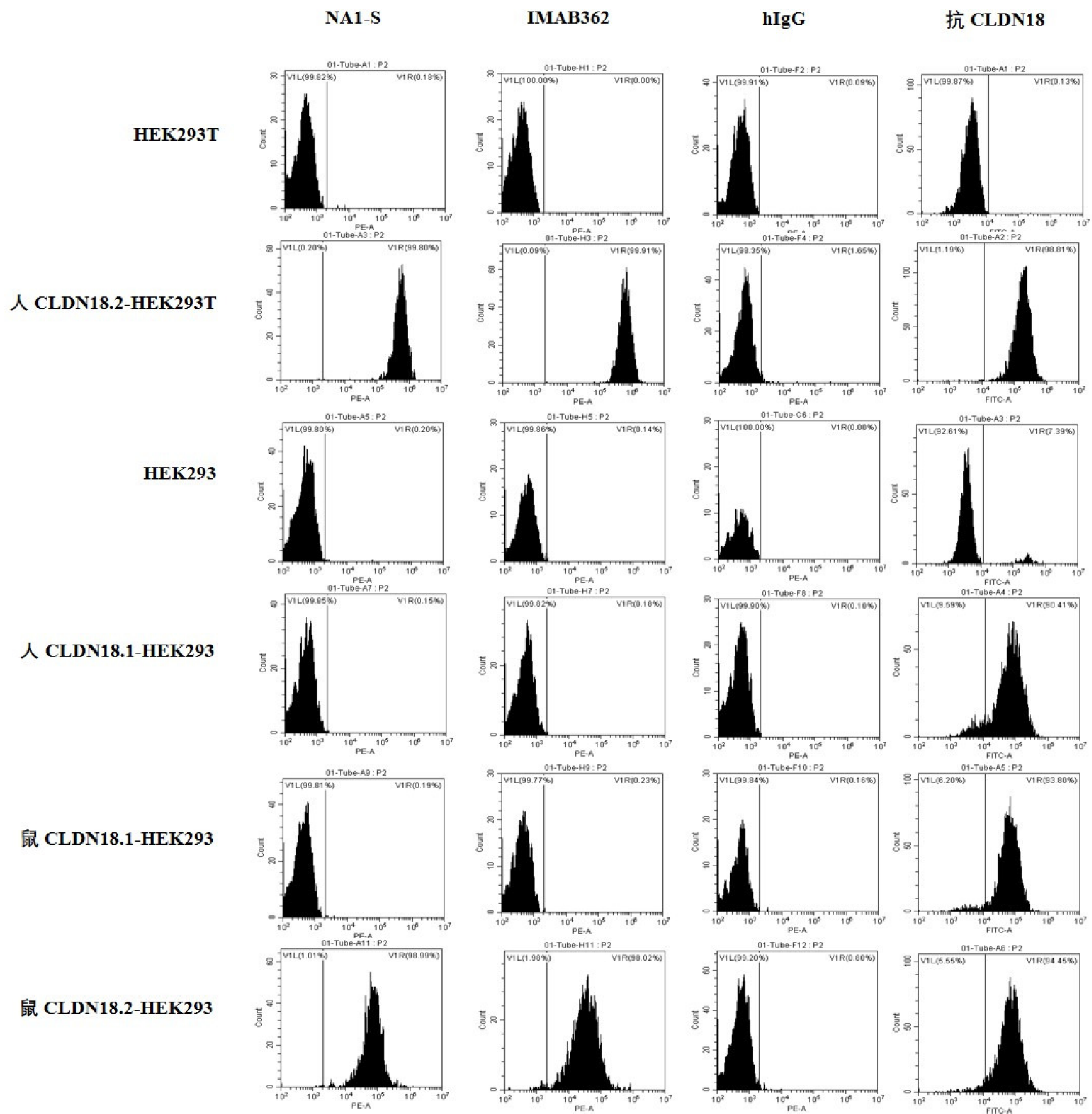


圖 3a

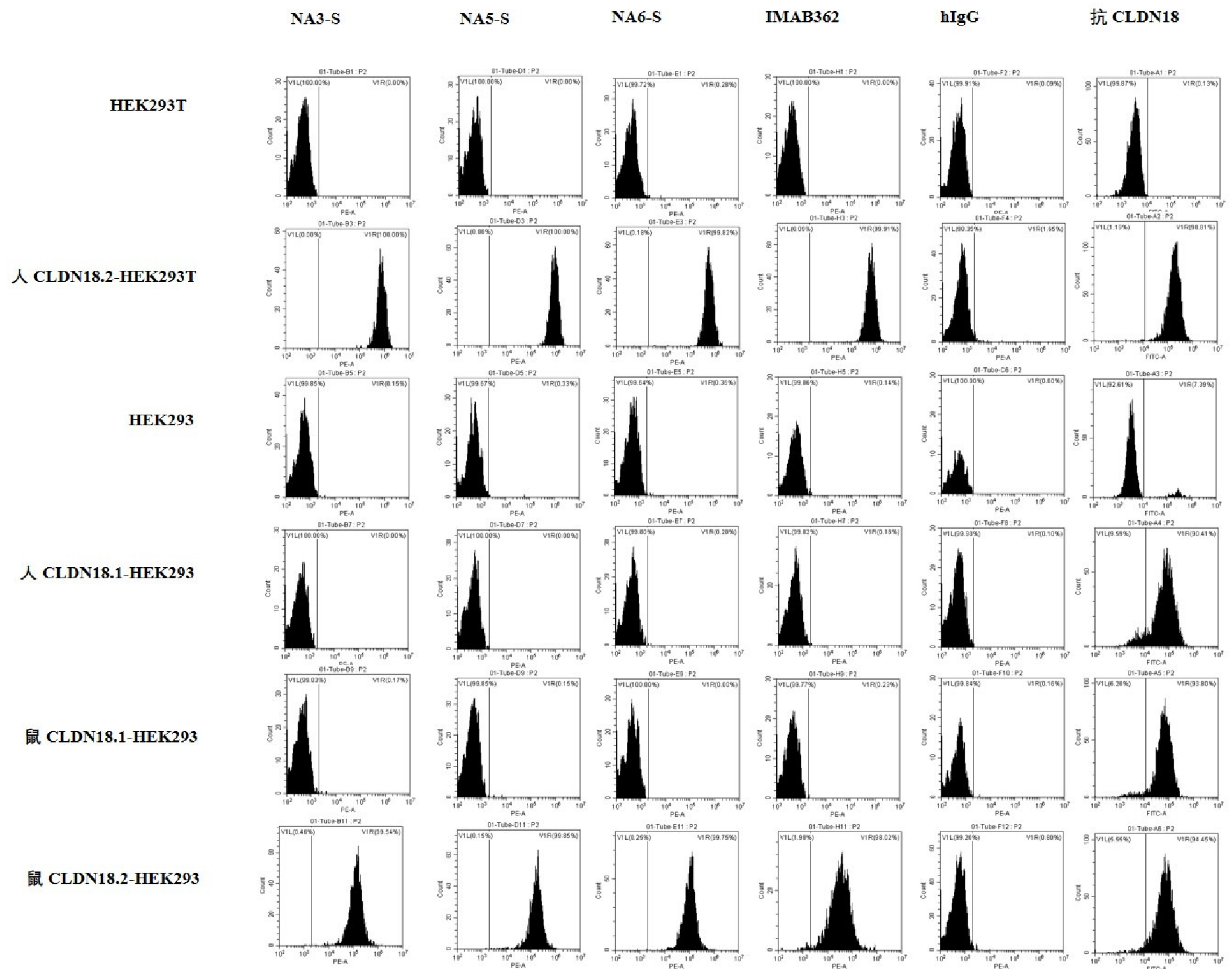


圖 3b

候選抗體在人 CLDN18.2-HEK293T 細胞上的結合

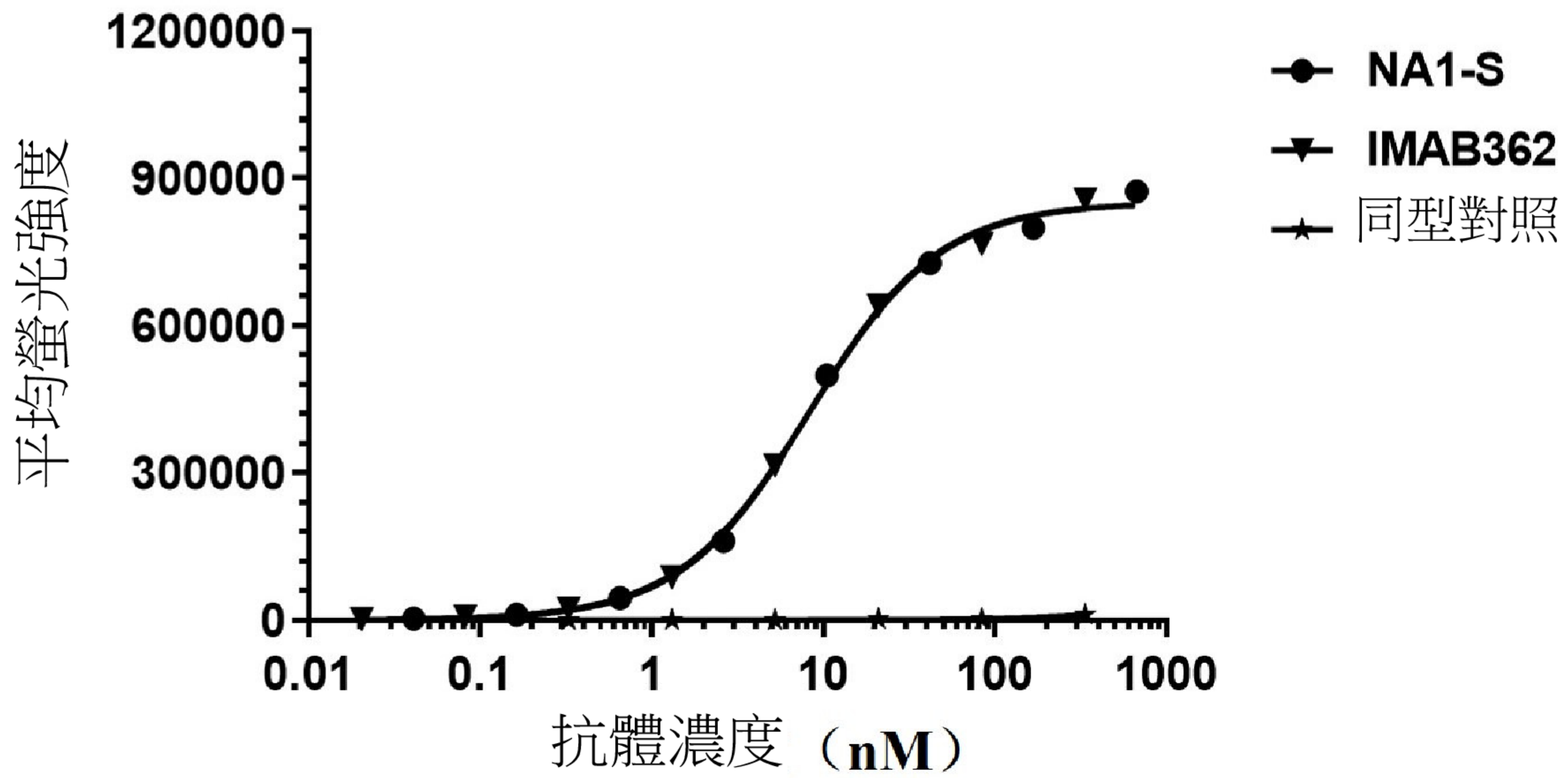


圖 4a

候選抗體在人 CLDN18.2-KATOIII 細胞上的結合

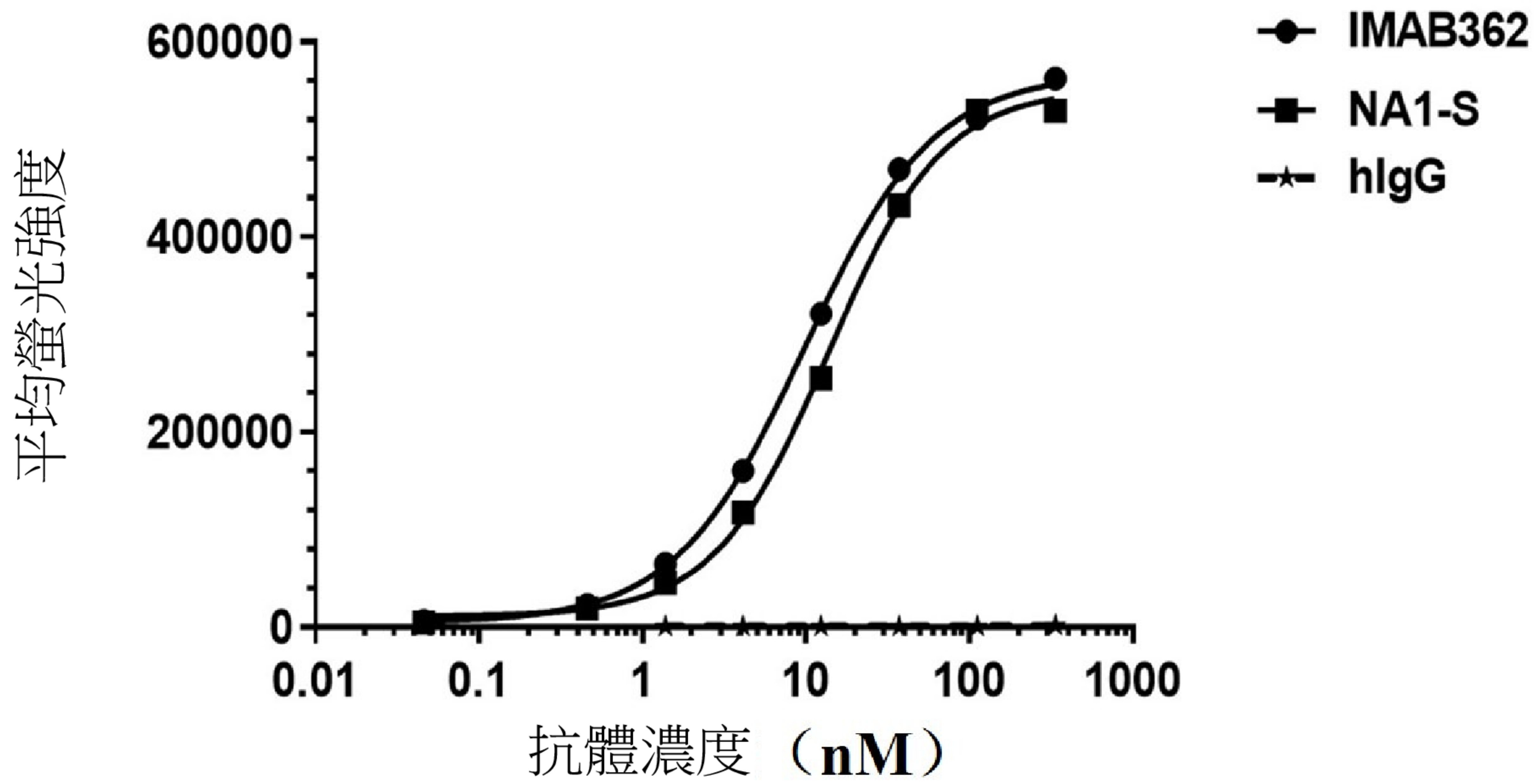


圖 4b

候選抗體在人 CLDN18.2-HEK293T 細胞上的結合

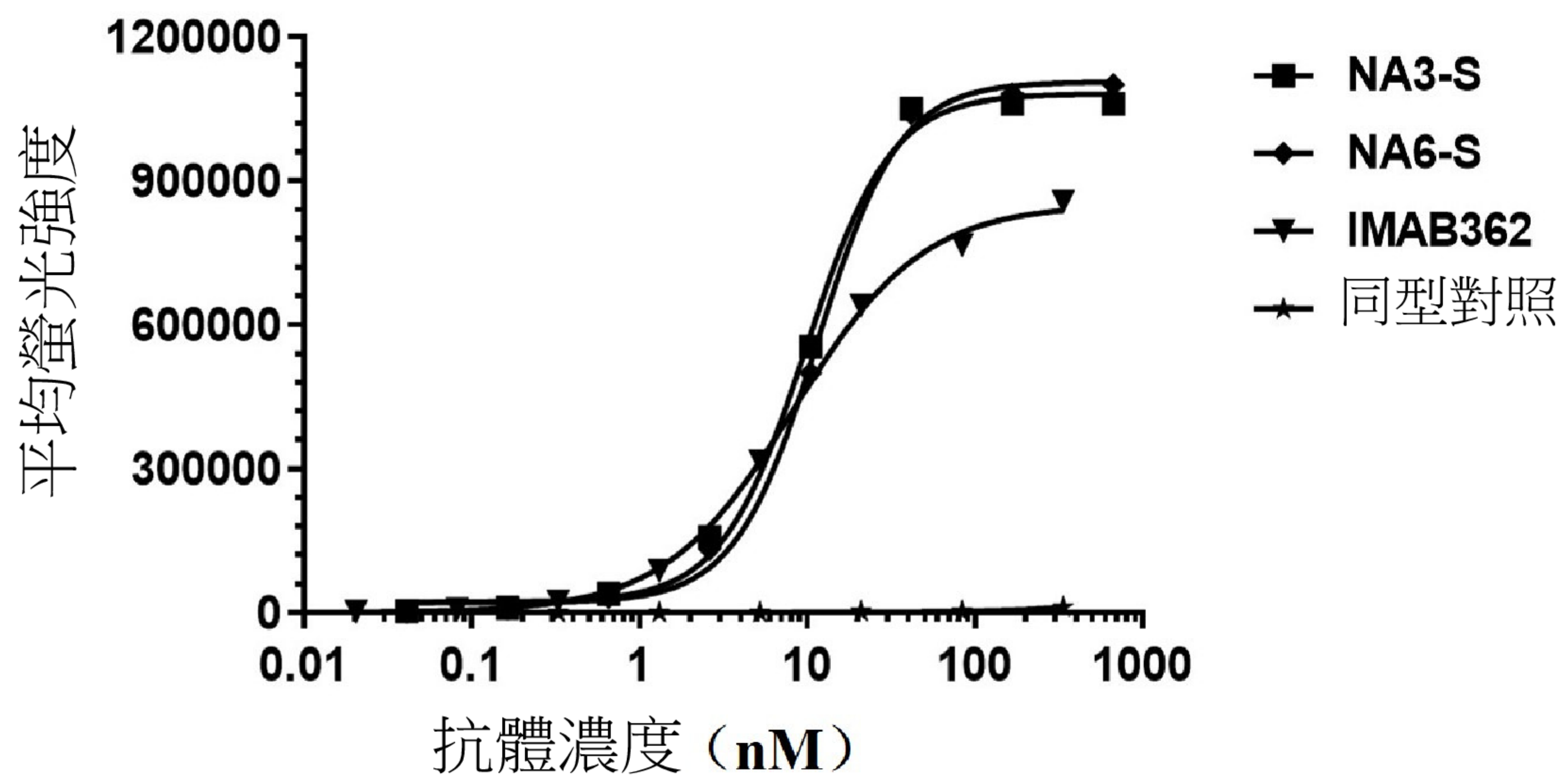


圖 5a

候選抗體在人 CLDN18.2-HEK293T 細胞上的結合

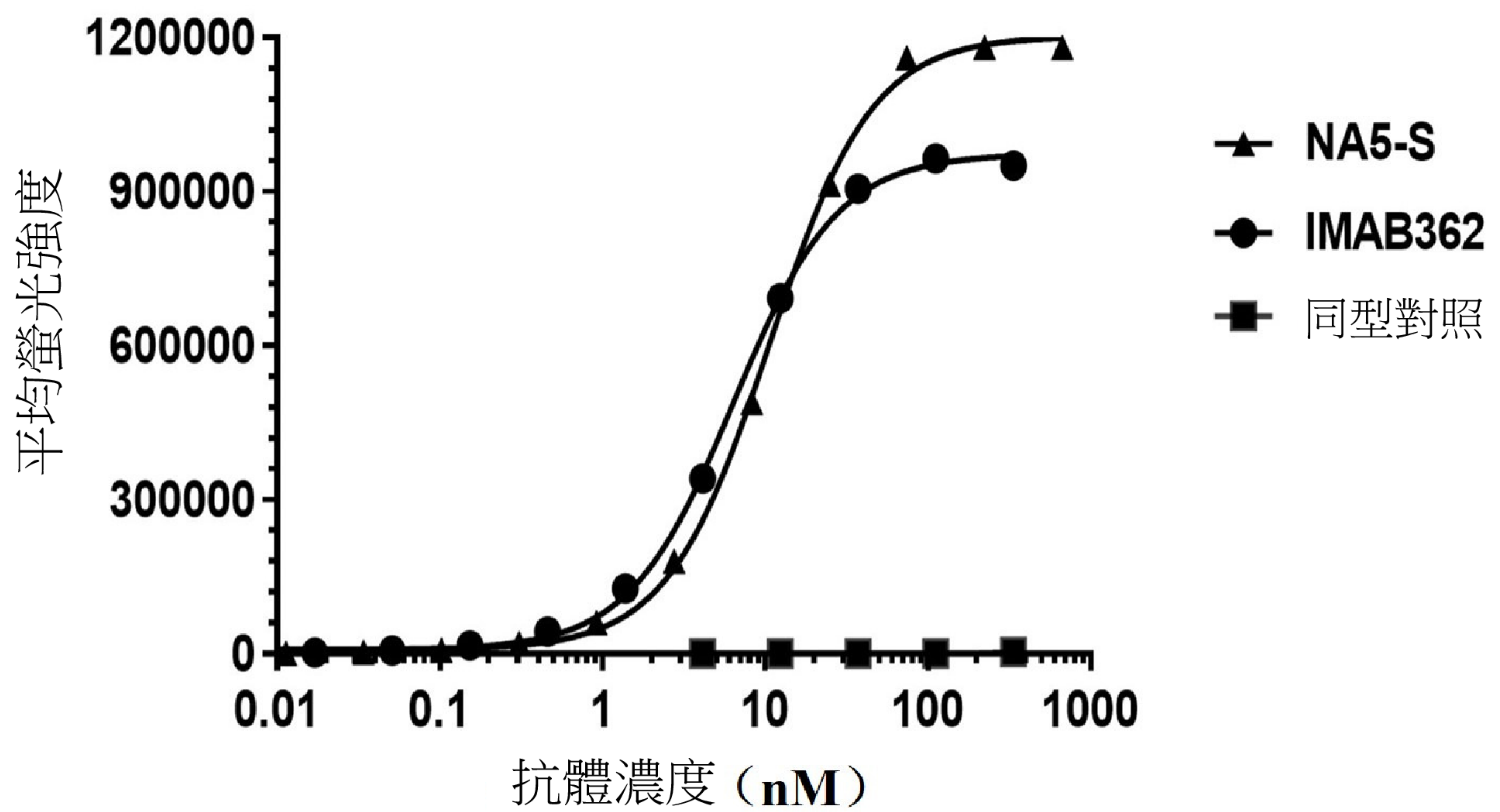


圖 5b

候選抗體在人 CLDN18.2-KATOIII 細胞上的結合

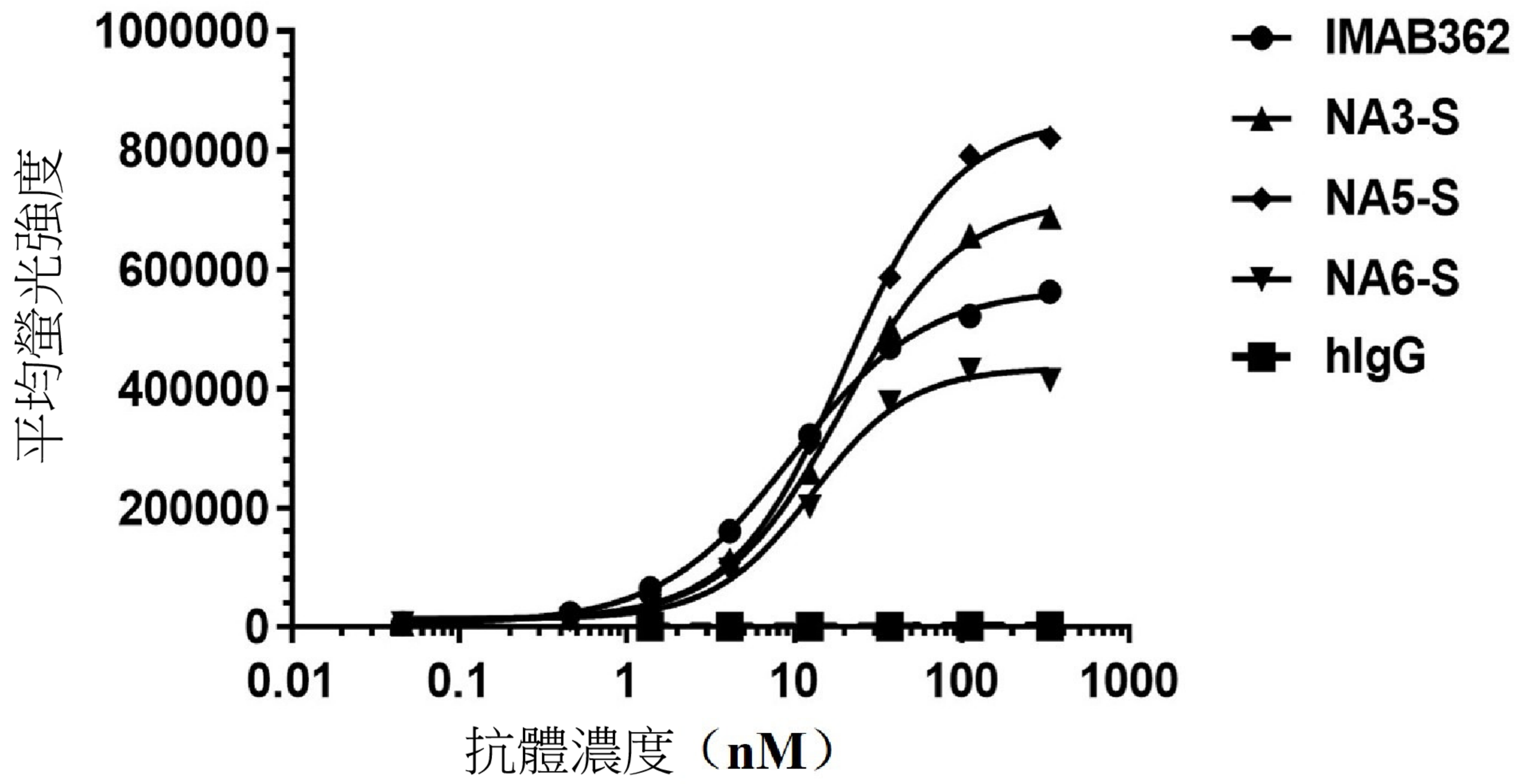


圖 5c

NA1-S 在人 CLDN18.2-HEK293T 細胞的 CDC 實驗

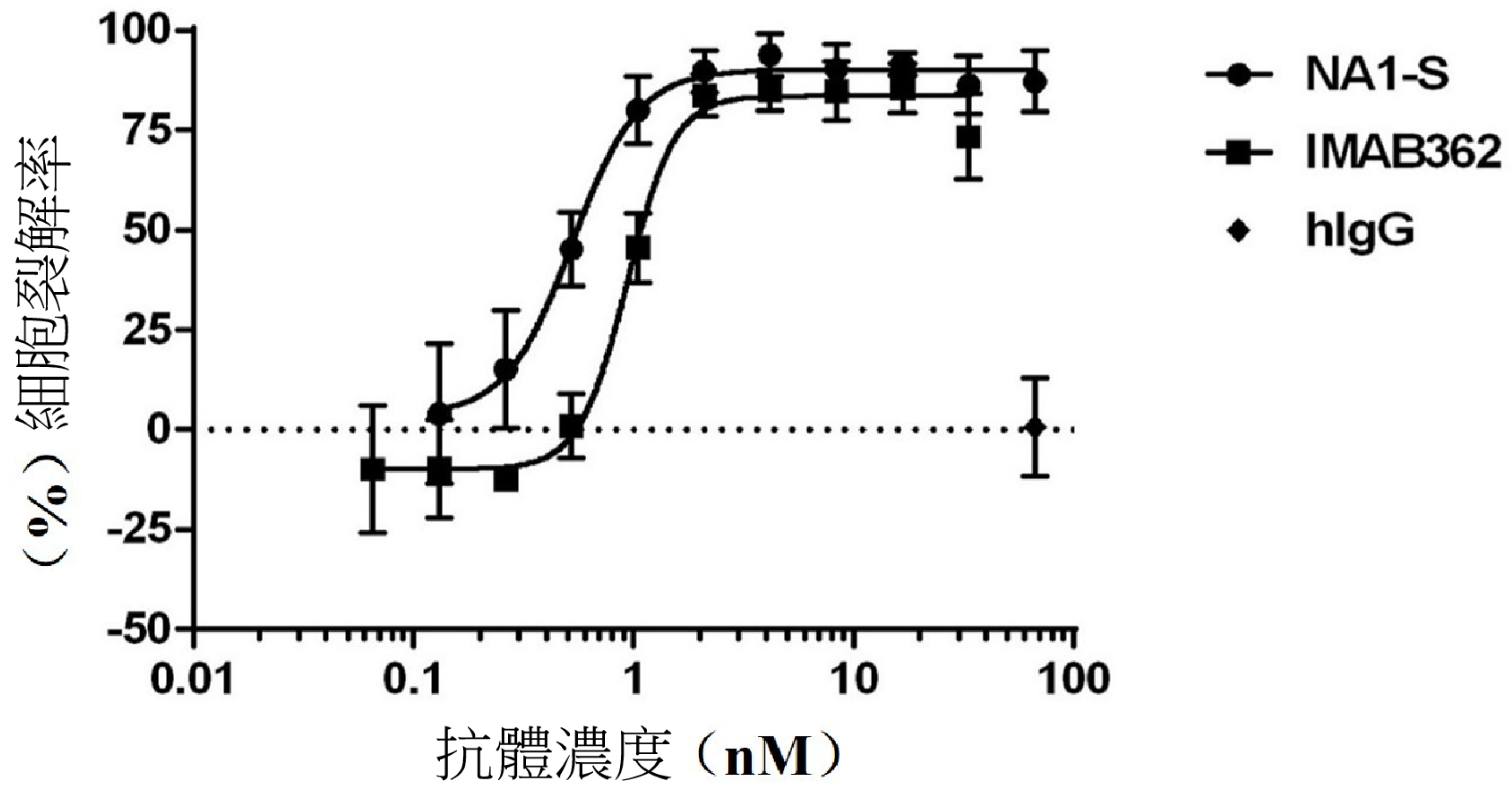


圖 6a

NA1-S 在人 CLDN18.2-KATOIII 細胞的 CDC 實驗

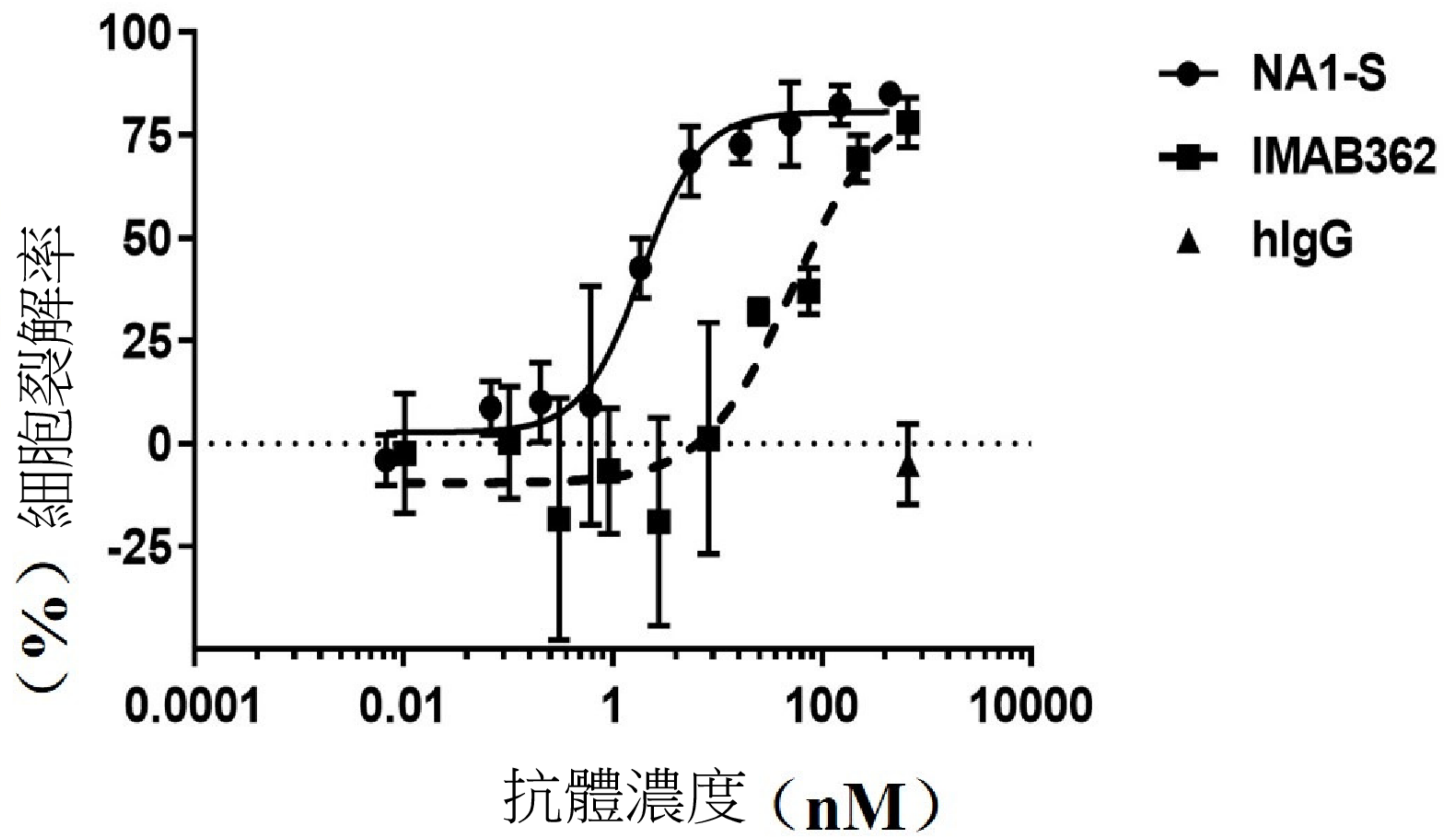


圖 6b

NA3-S 在人 CLDN18.2-HEK293T 細胞的 CDC 實驗

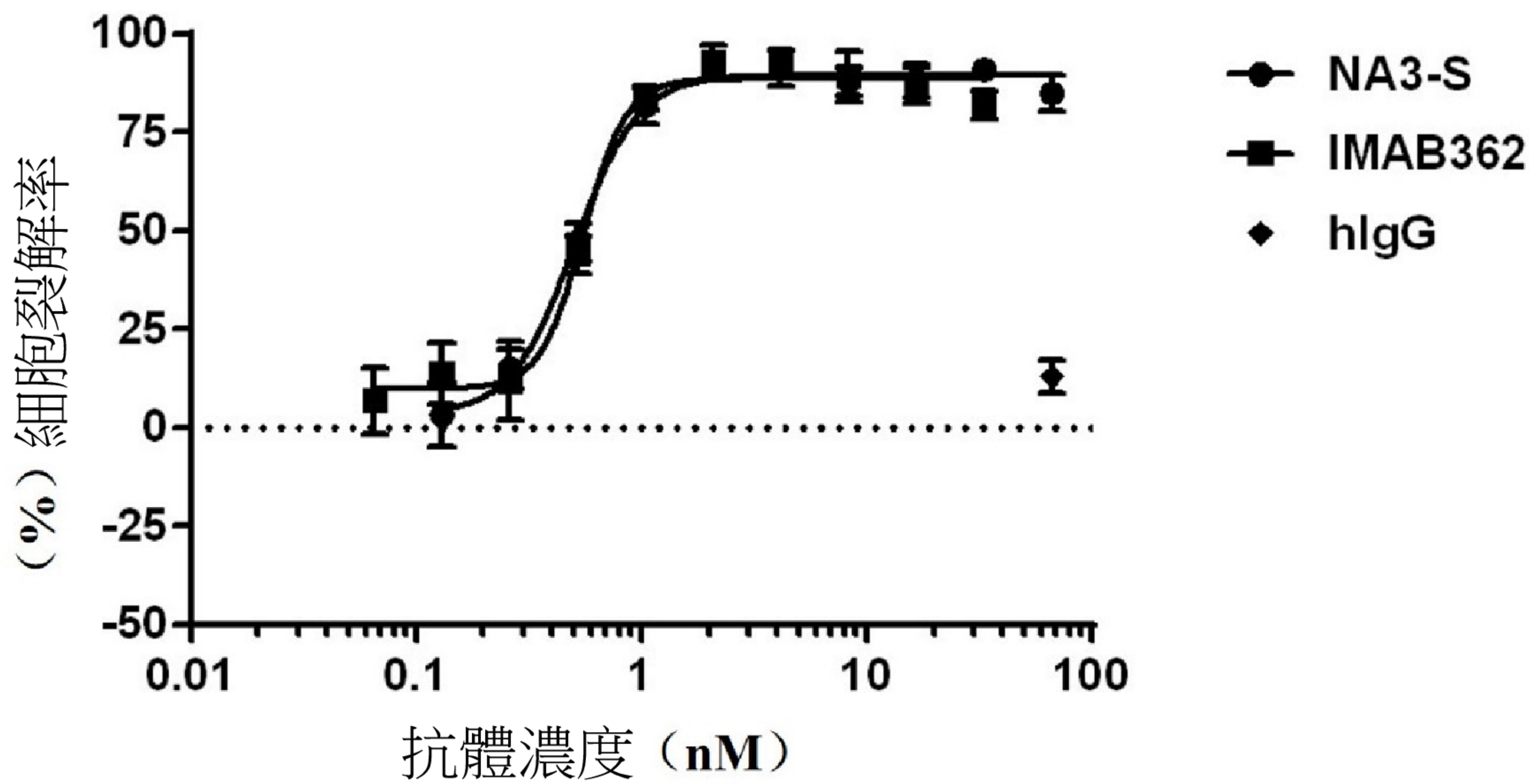


圖 7a

NA5-S 在人 CLDN18.2-HEK293T 細胞的 CDC 實驗

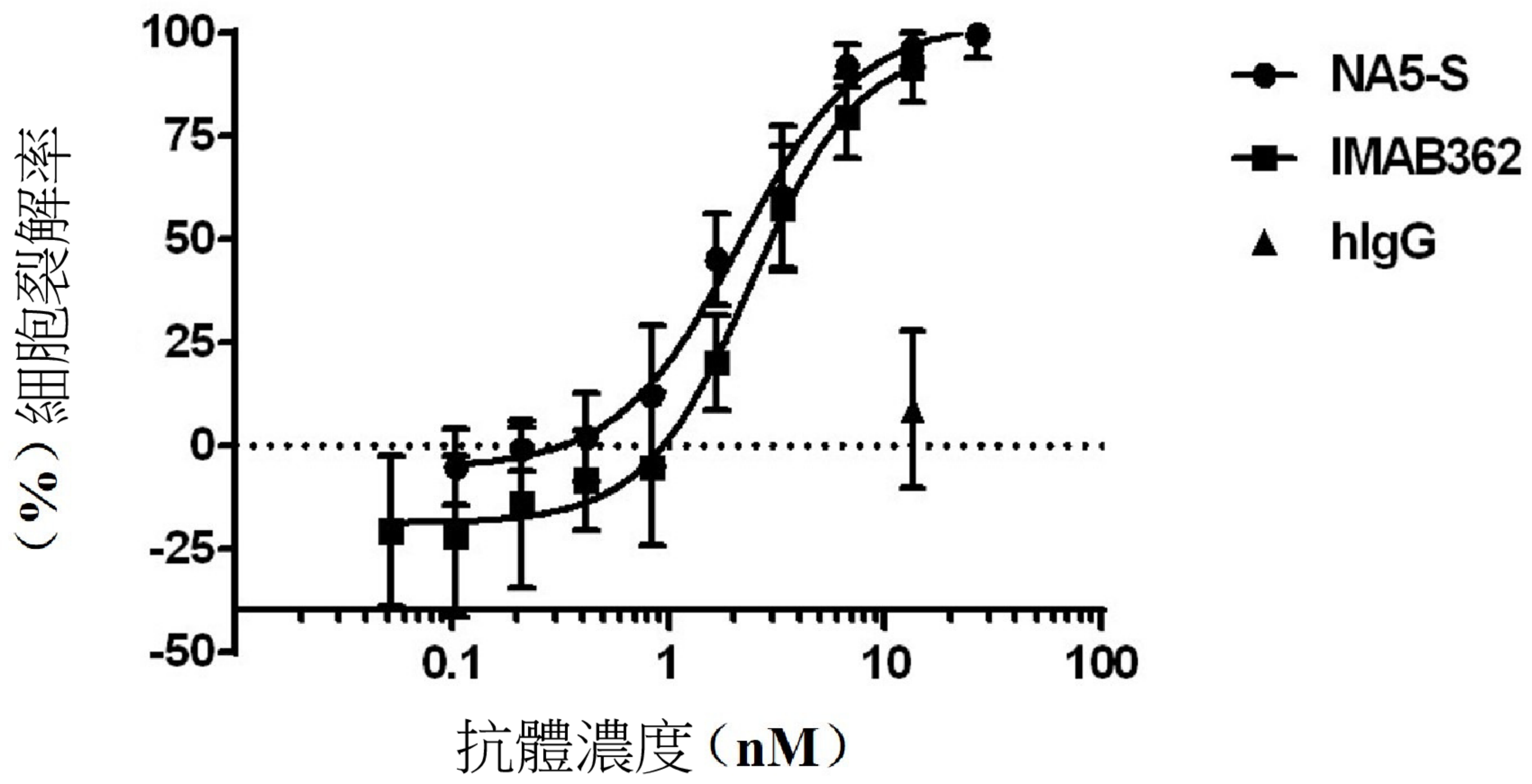


圖 7b

NA6-S 在人 CLDN18.2-HEK293T 細胞的 CDC 實驗

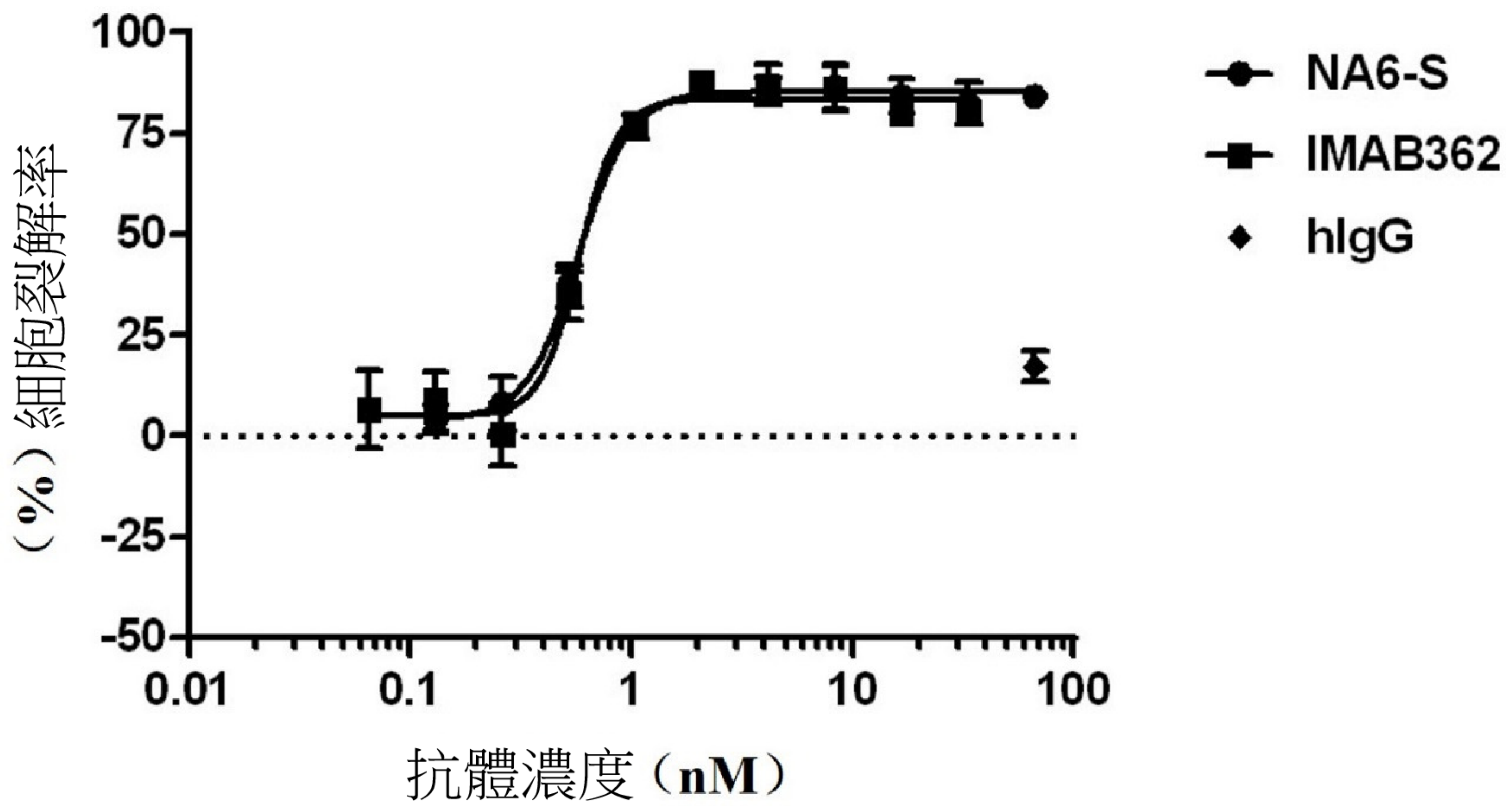


圖 7c

NA3-S 在人 CLDN18.2-KATOIII 細胞的 CDC 實驗

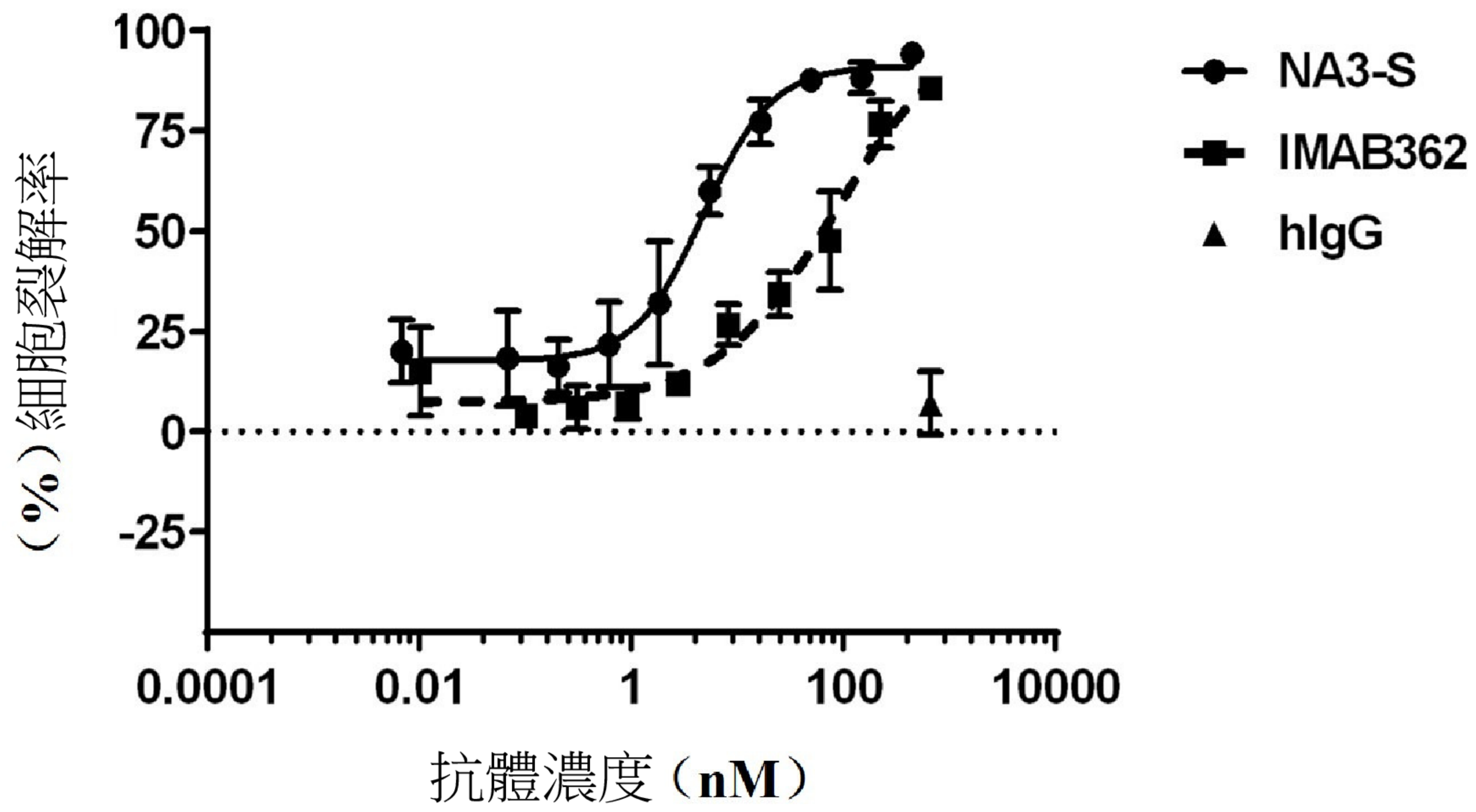


圖 7d

NA1-S 在人 CLDN18.2-HEK293T 細胞的 ADCC 實驗

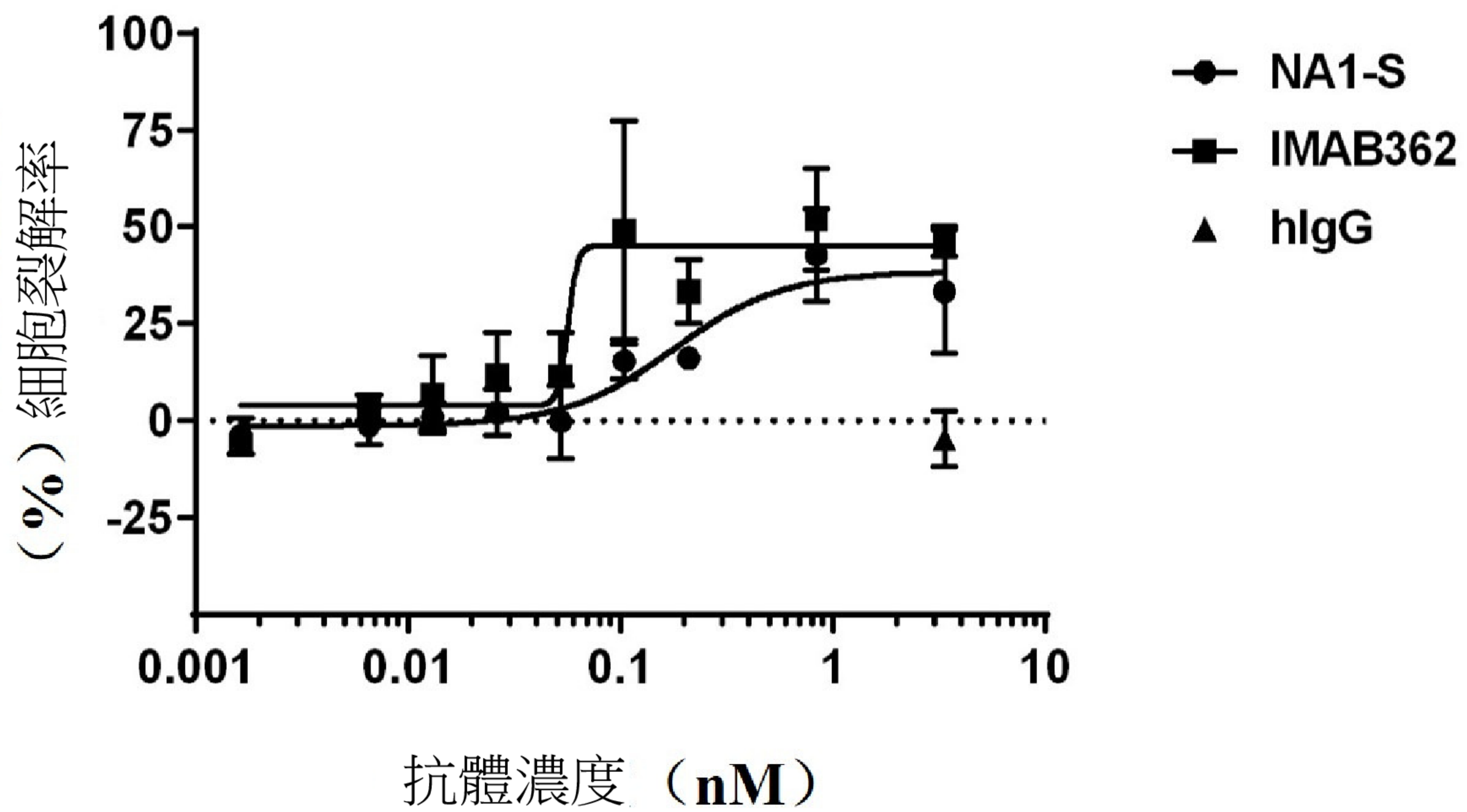


圖 8a

NA1-S 在人 CLDN18.2-KATOIII 細胞的 ADCC 實驗

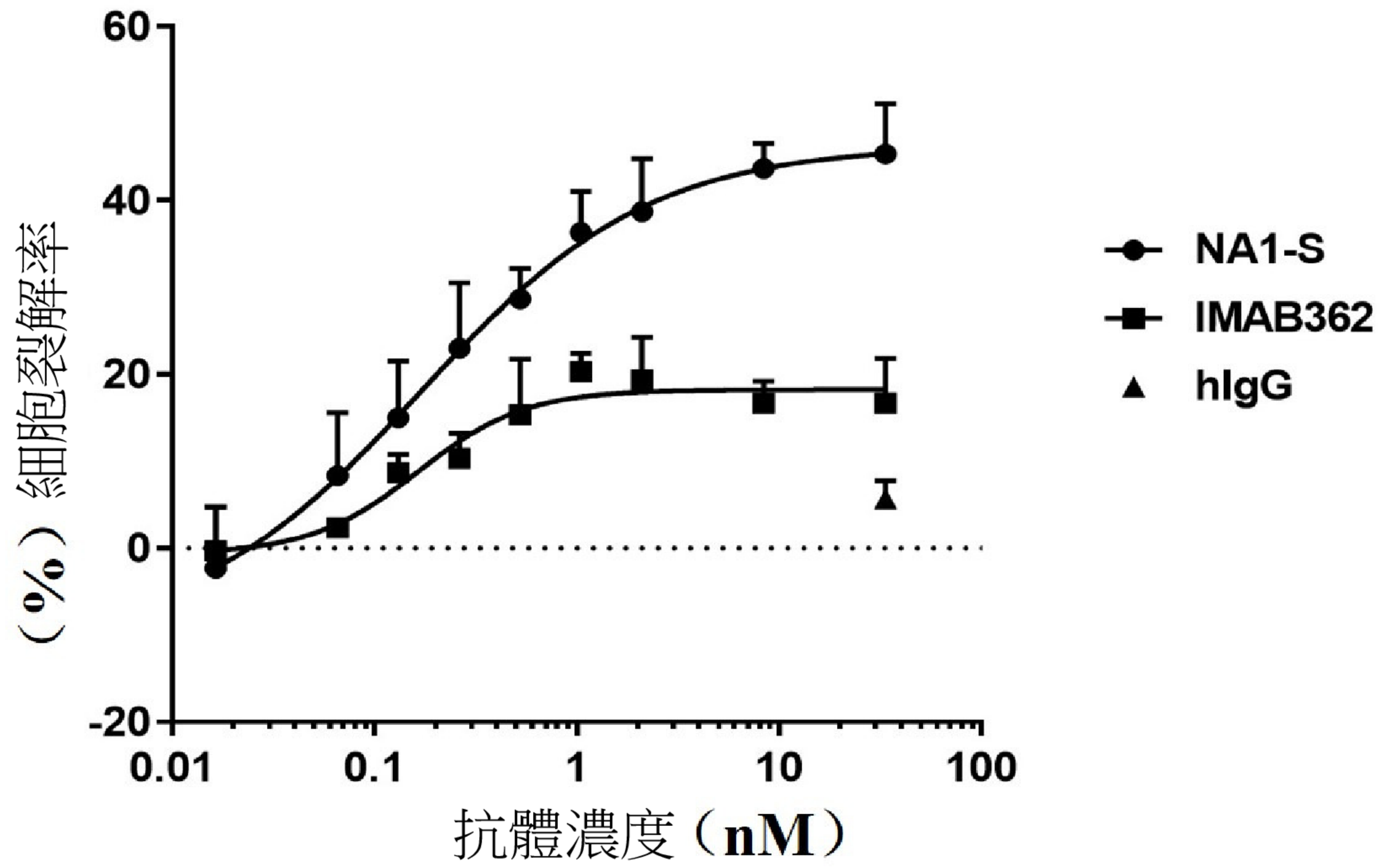


圖 8b

NA3-S 在人 CLDN18.2-HEK293T 細胞的 ADCC 實驗

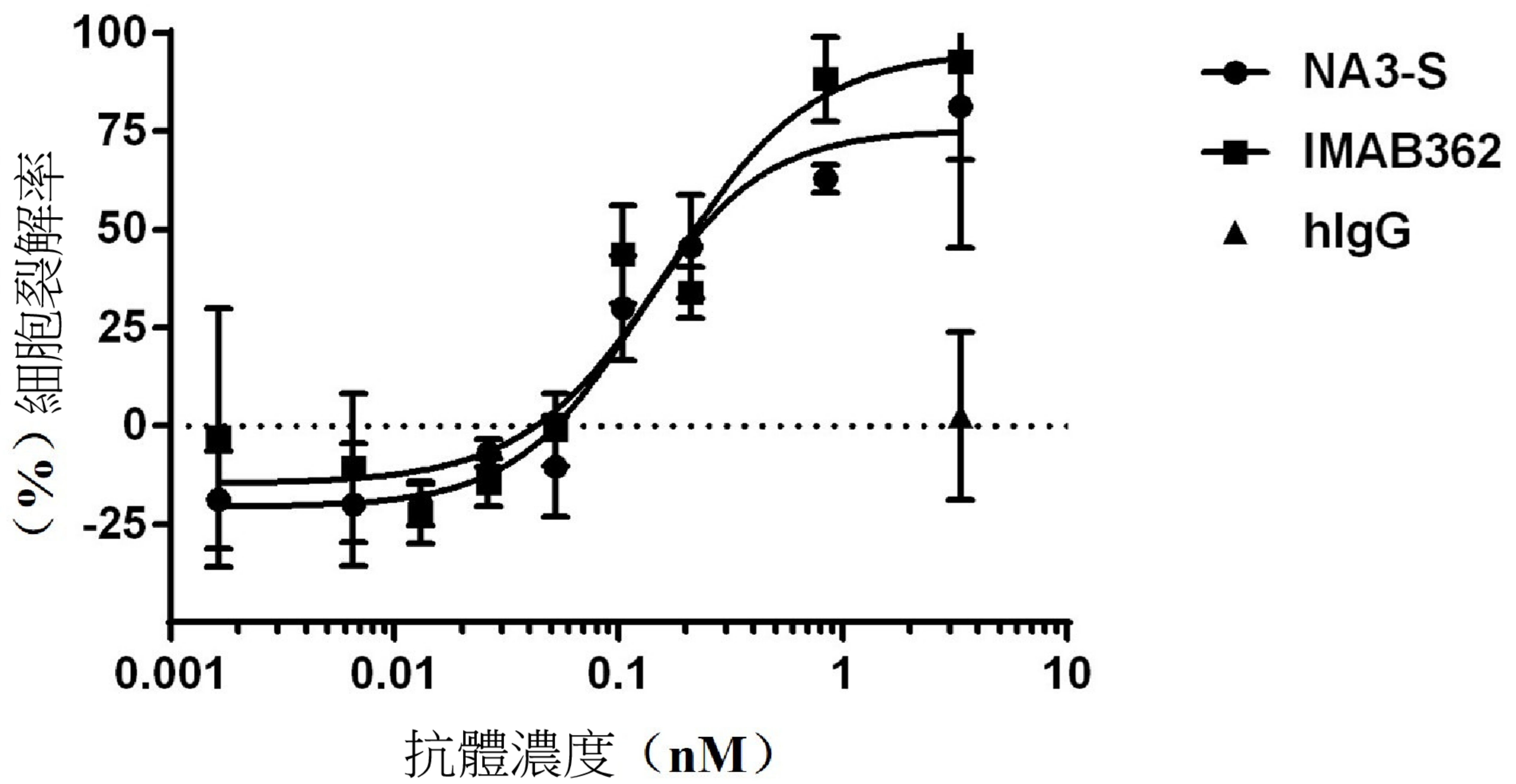


圖 8c

NA3-S 在人 CLDN18.2-KATOIII 細胞的 ADCC 實驗

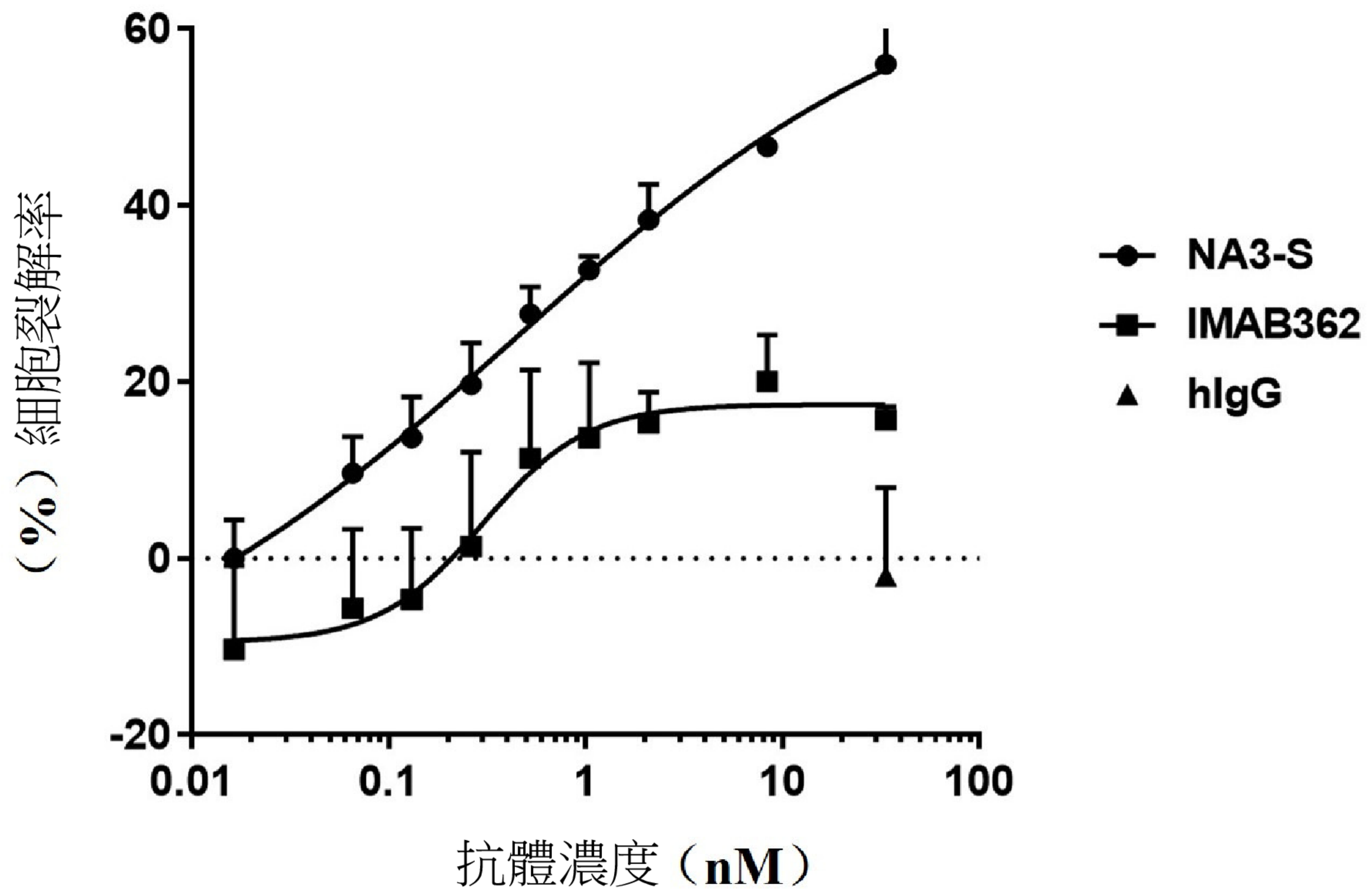


圖 8d

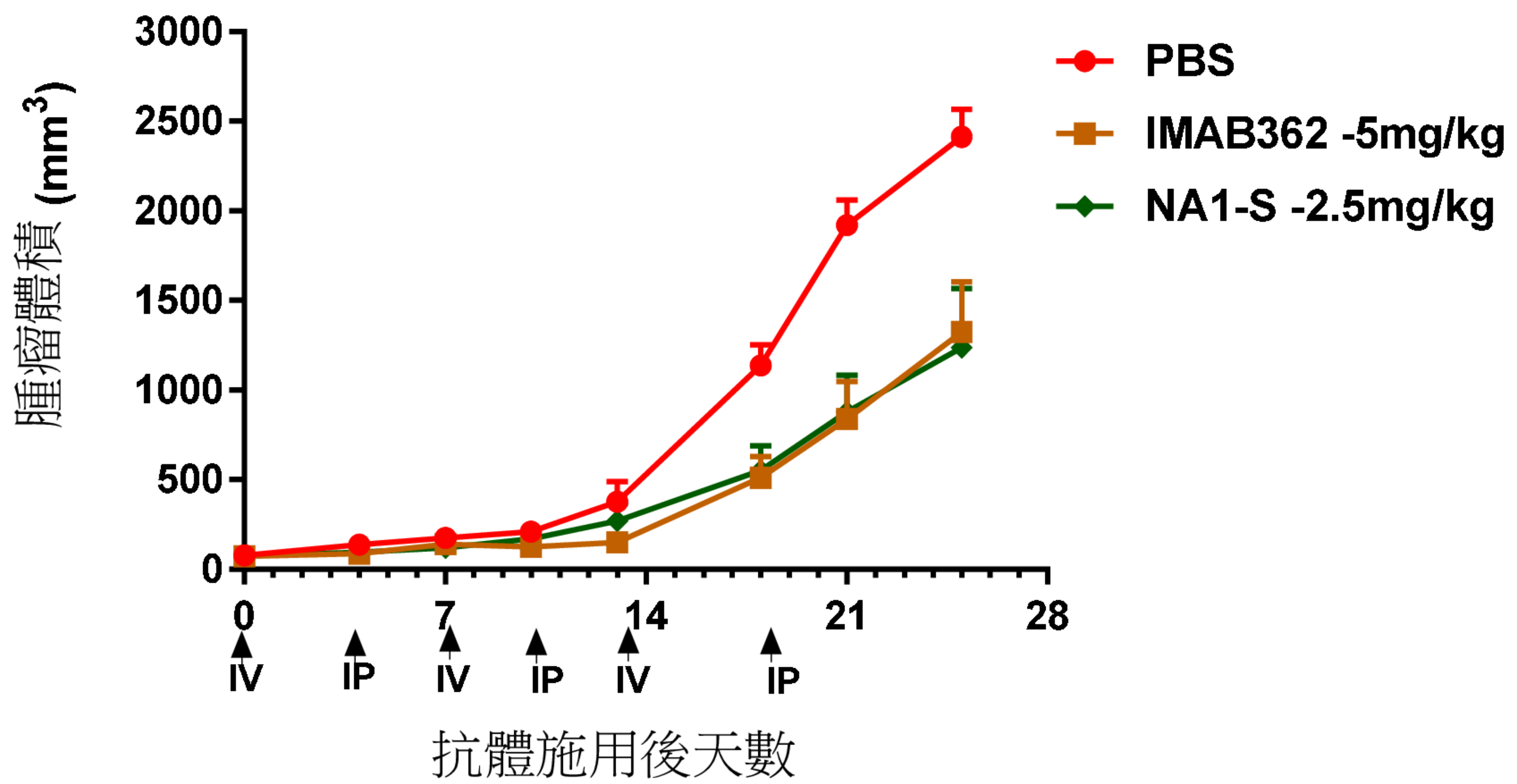


圖 9a

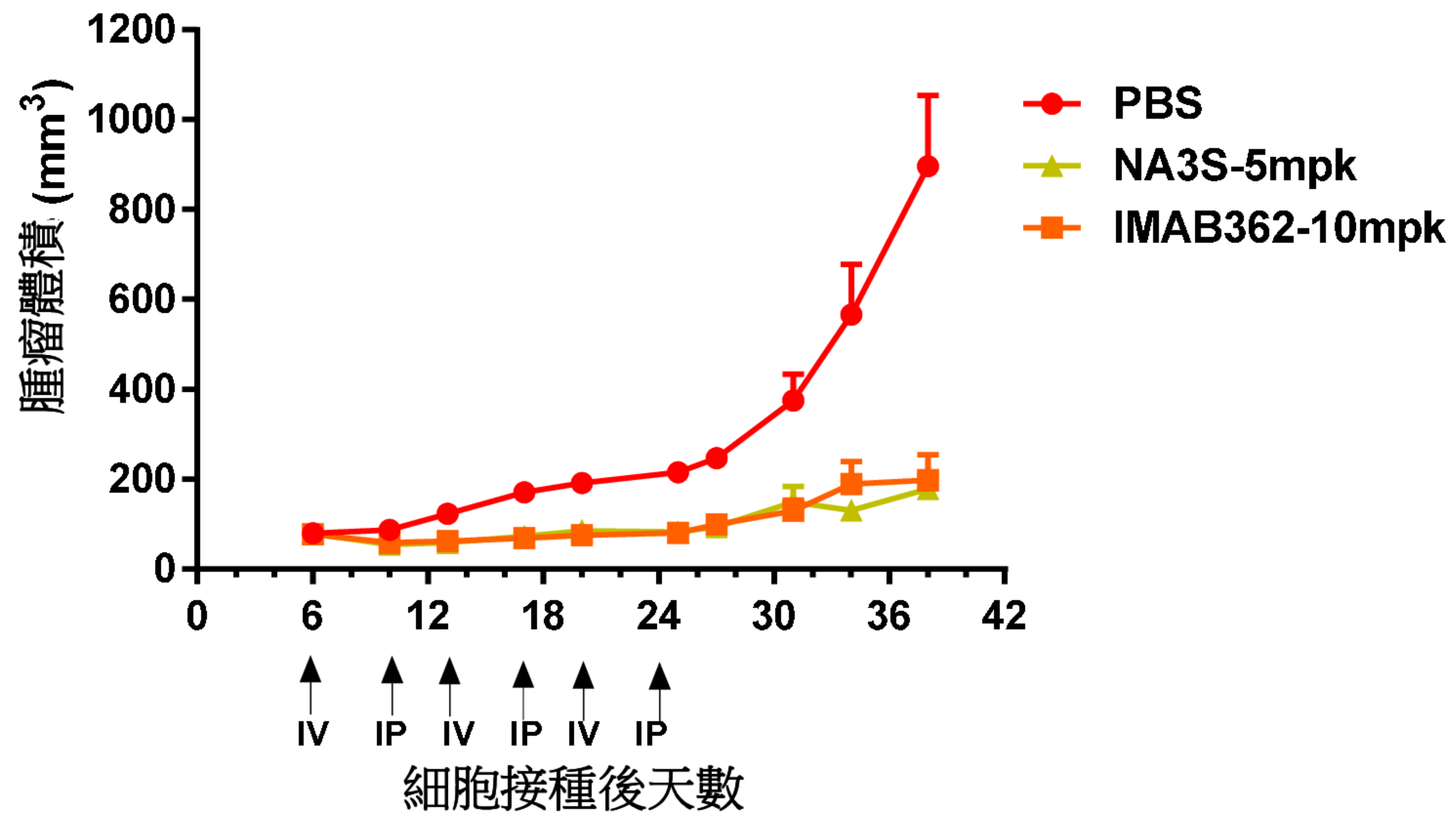


圖 9b

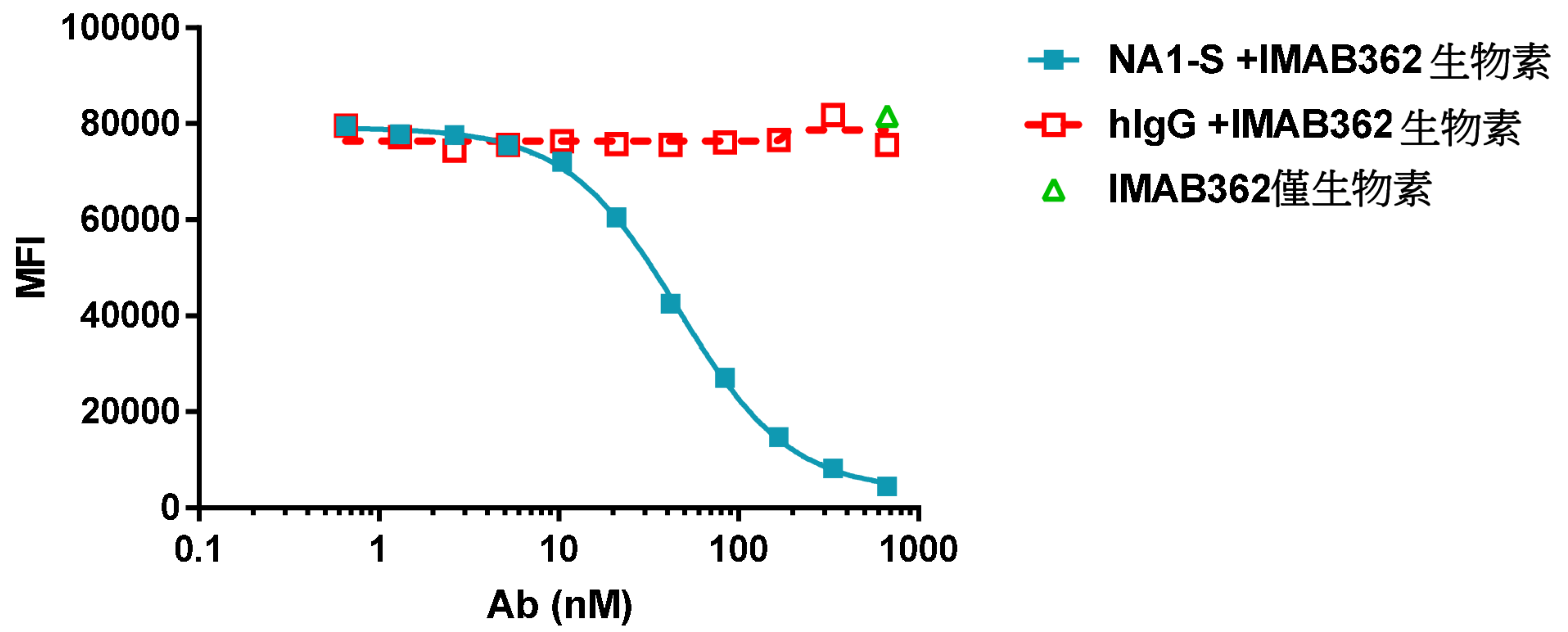


圖 10a

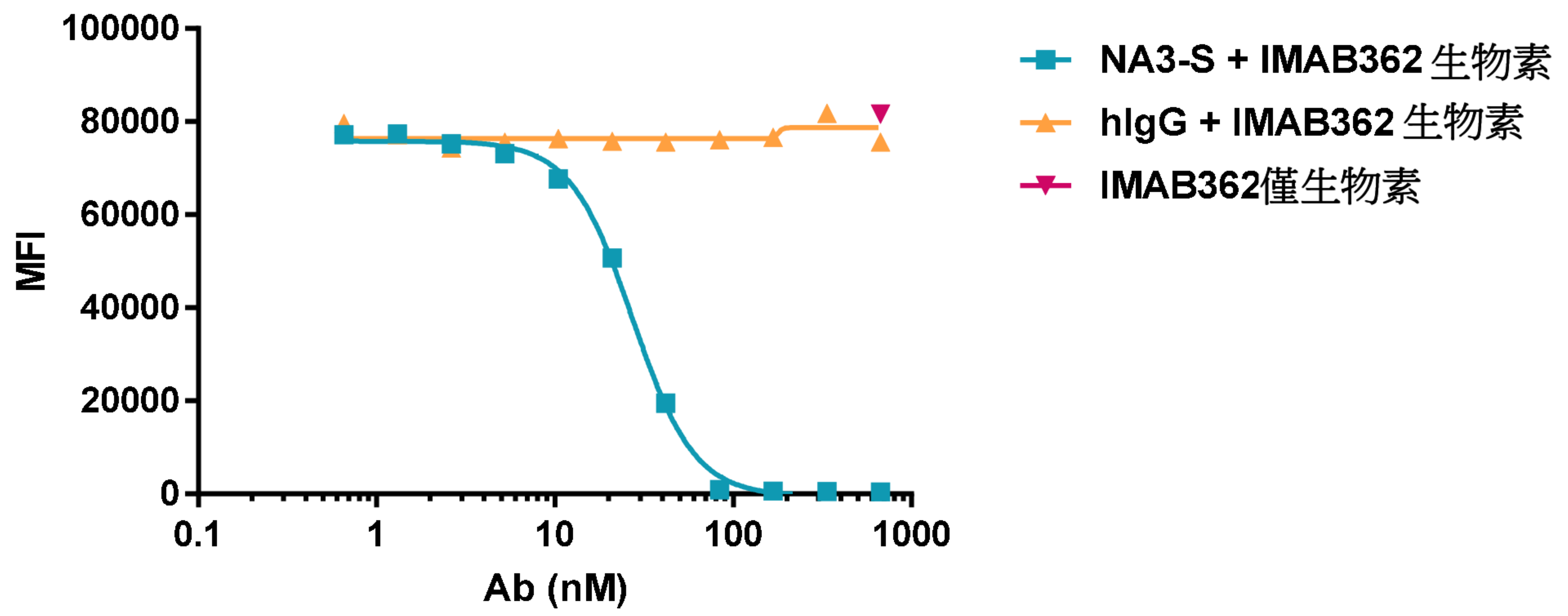


圖 10b

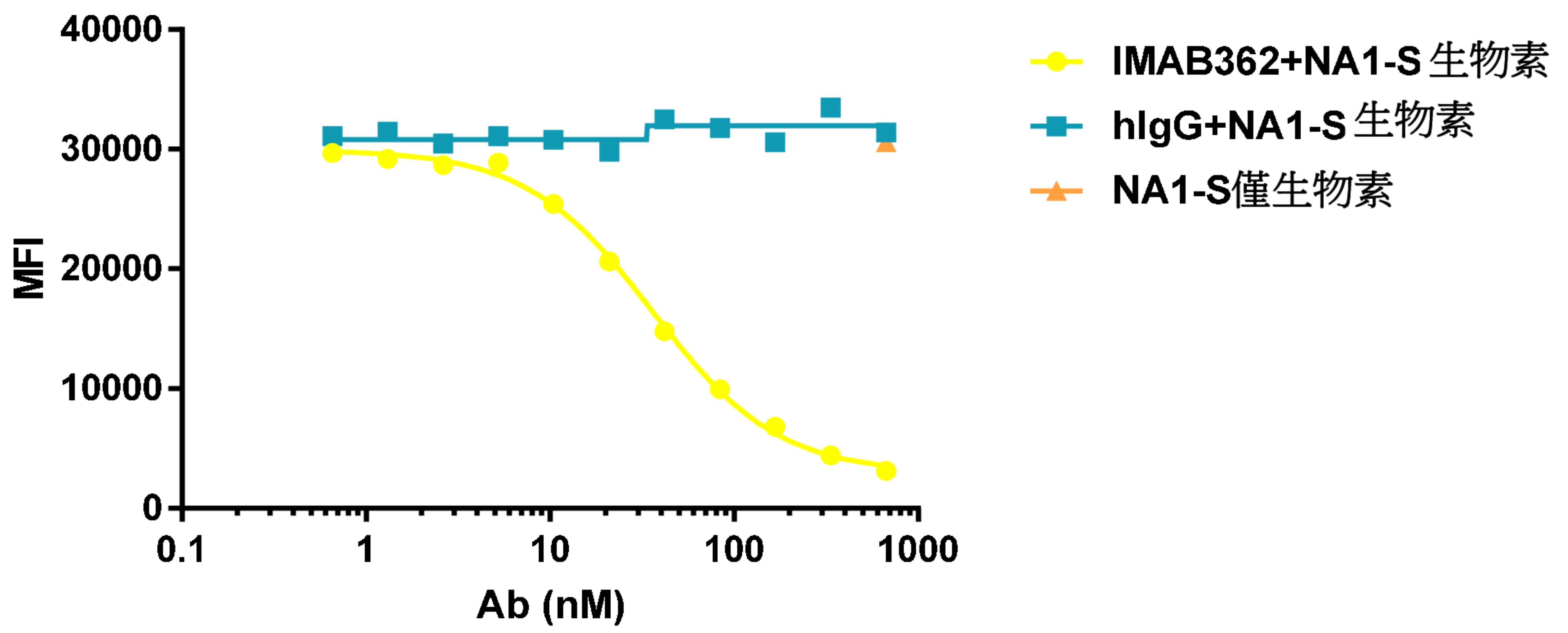


圖 10c

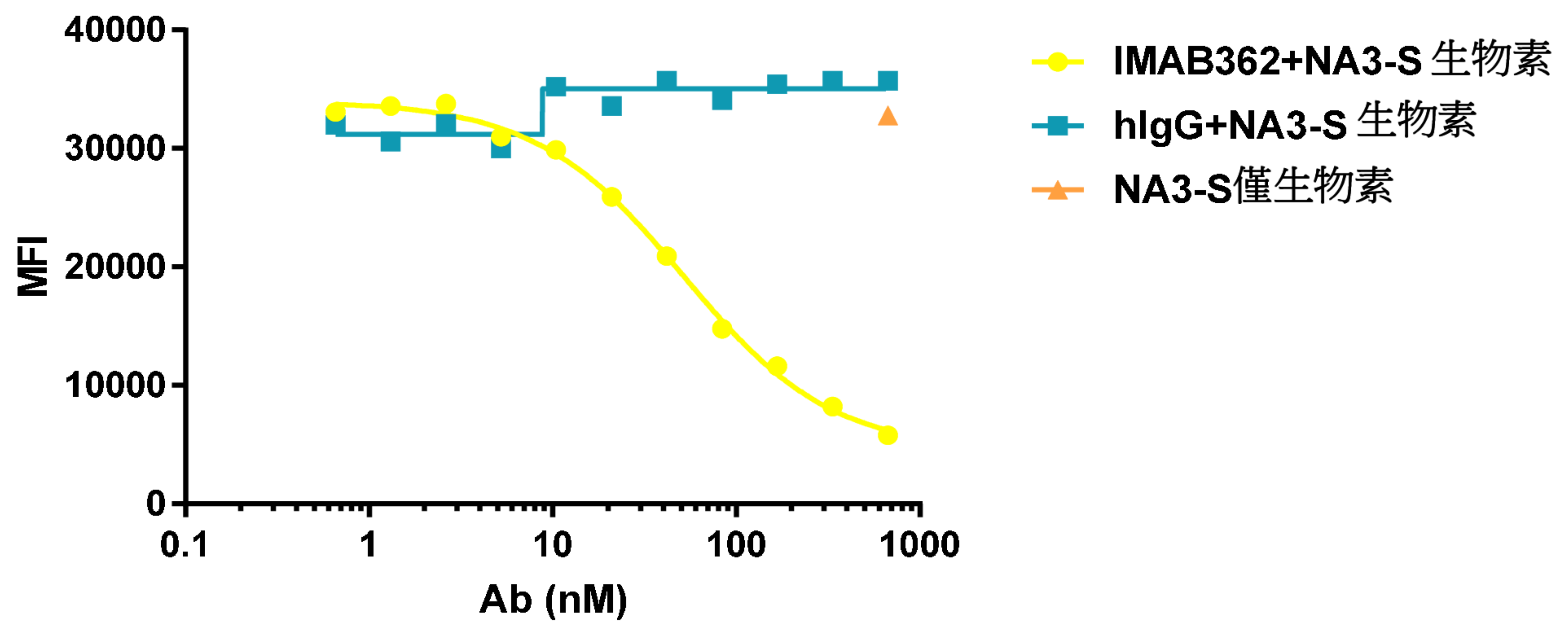


圖 10d

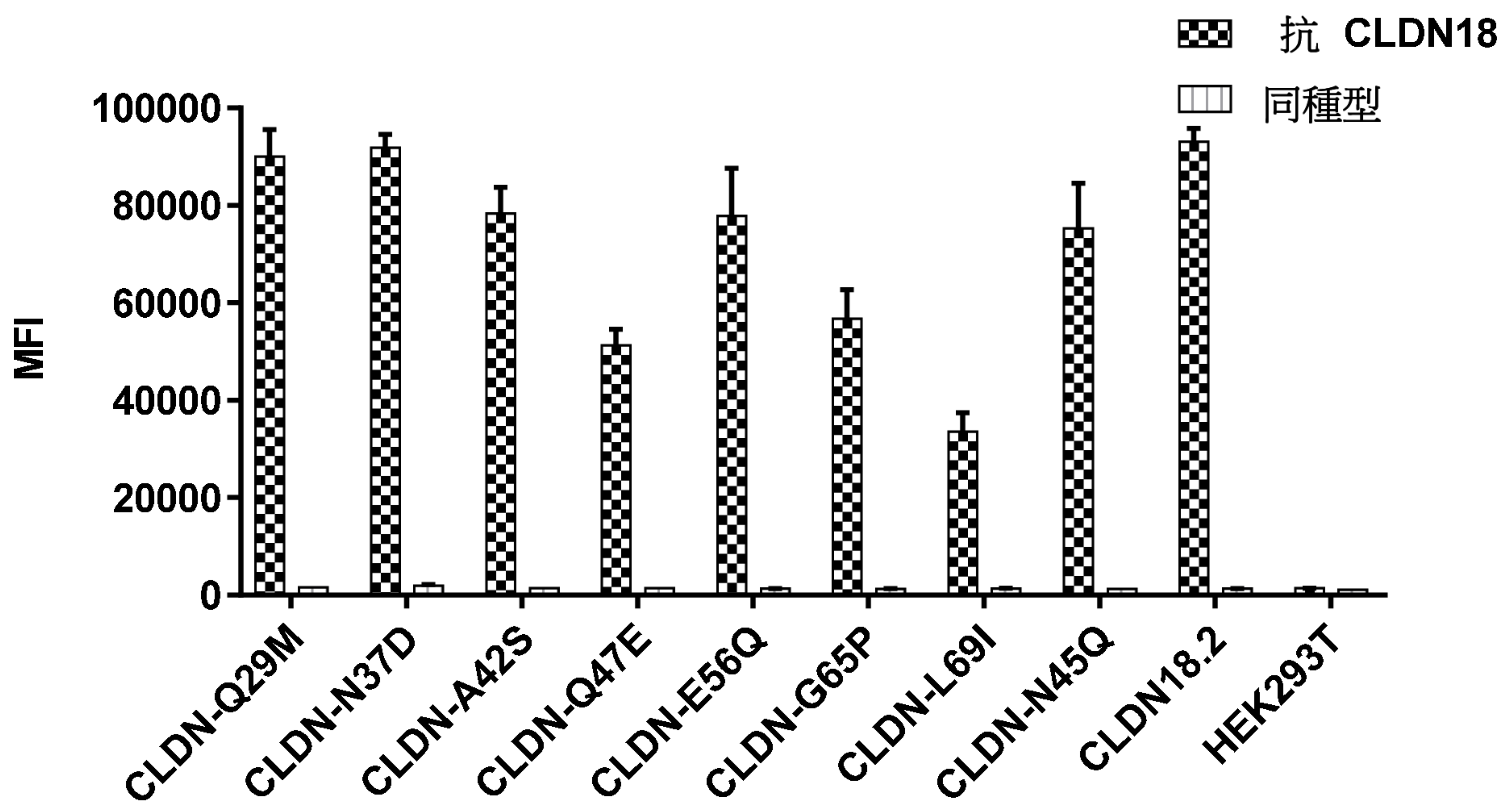


圖 10e

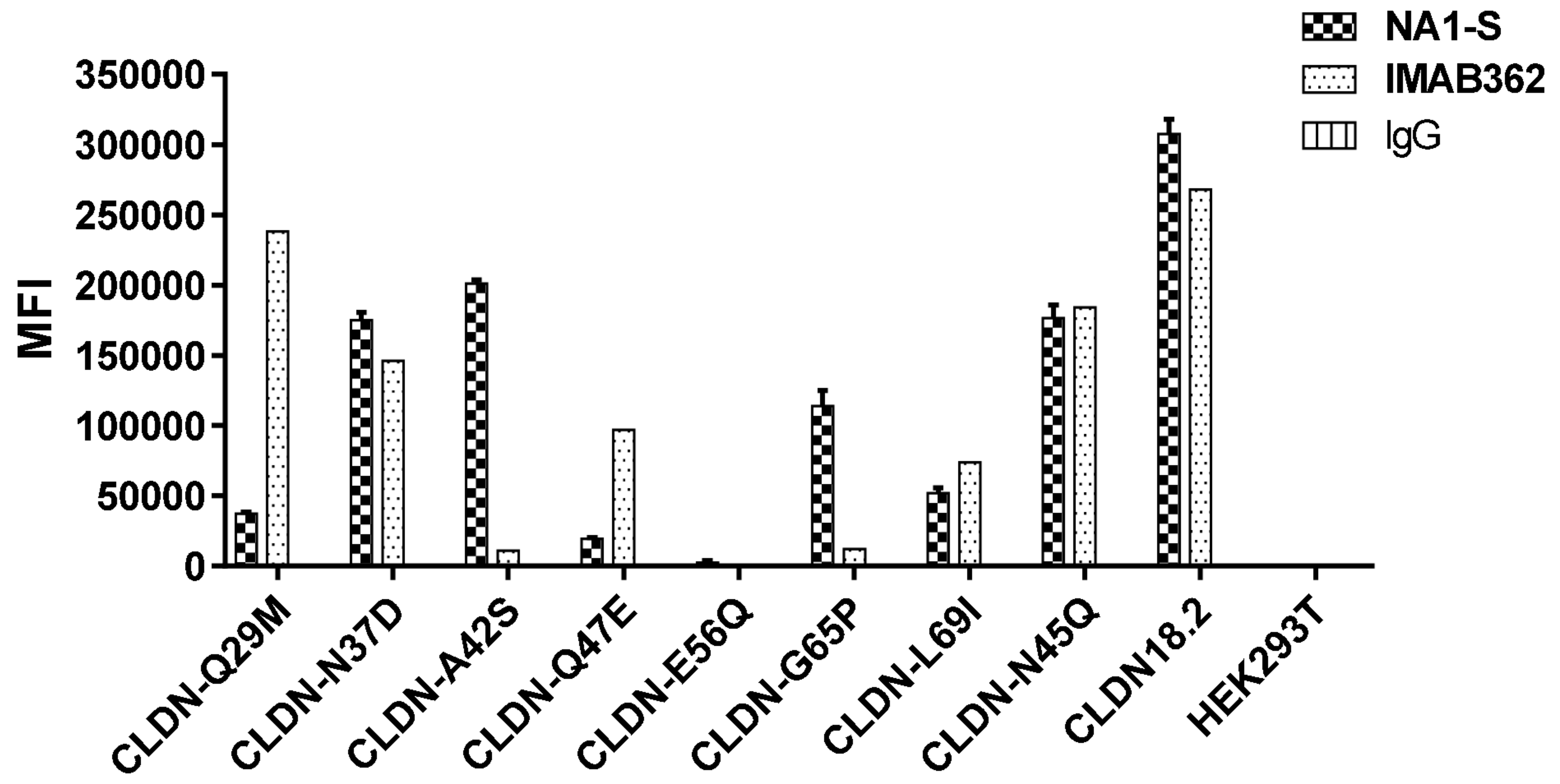


圖 10f

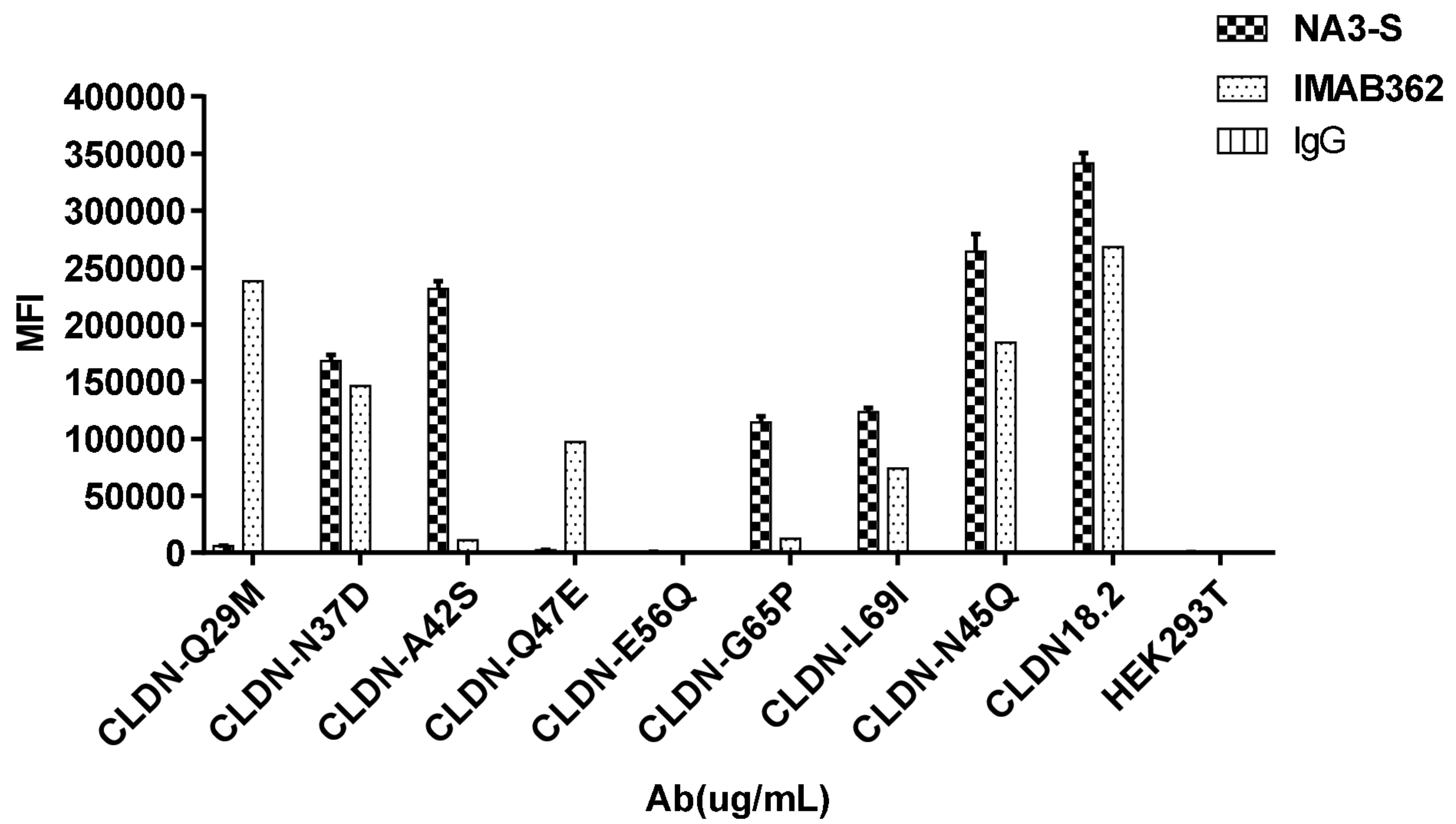


圖 10g

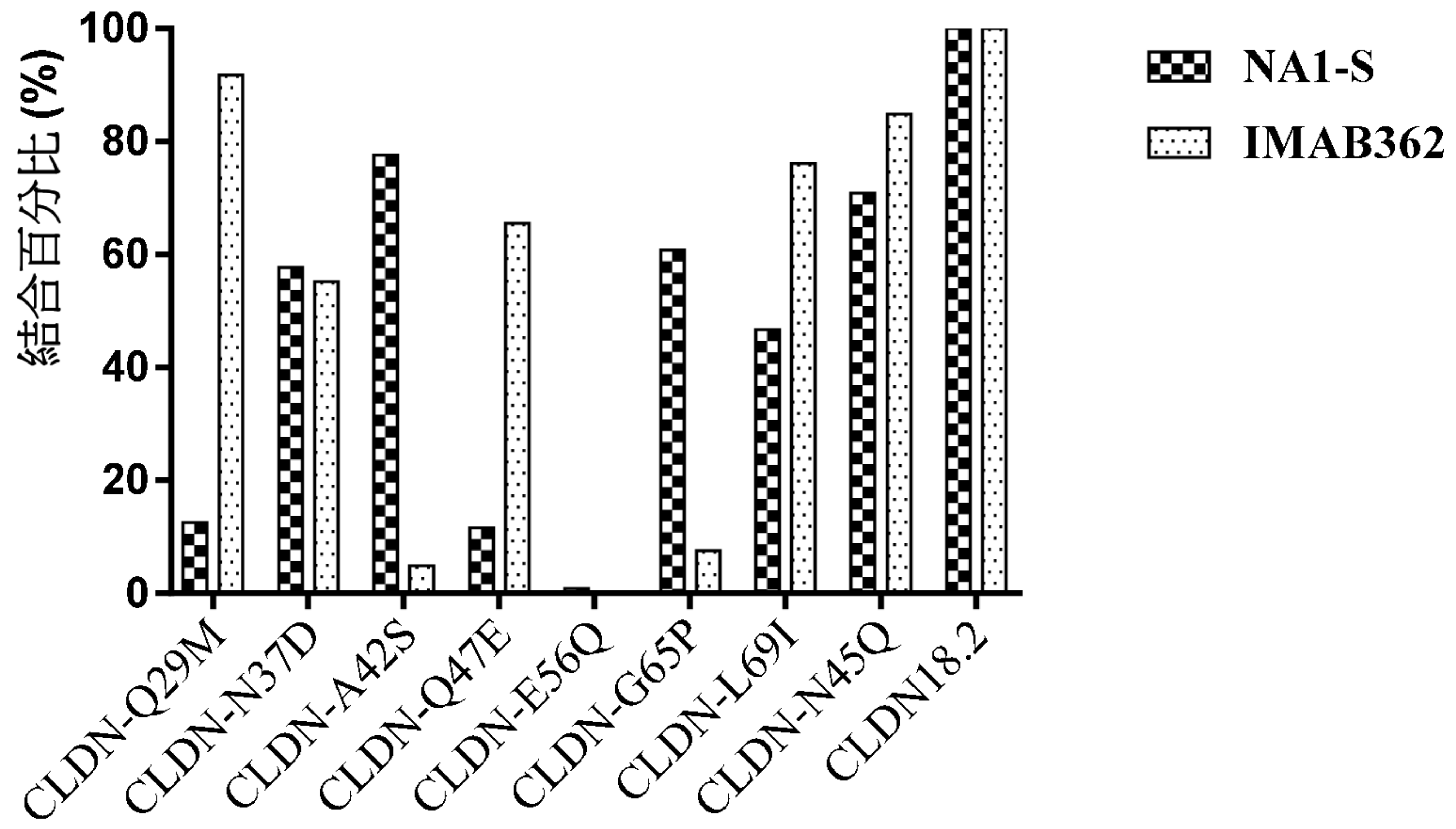


圖 10h

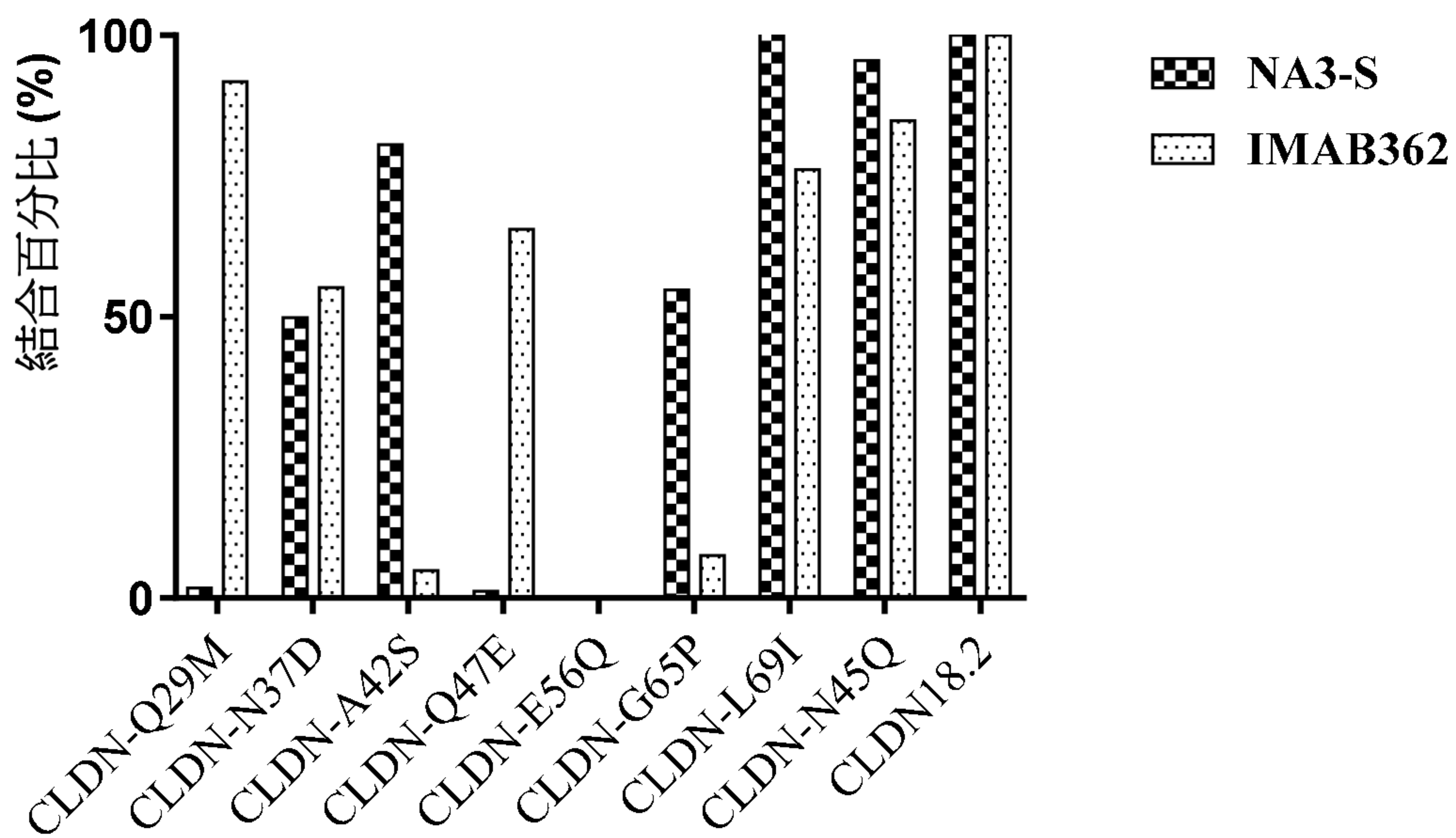


圖 10i

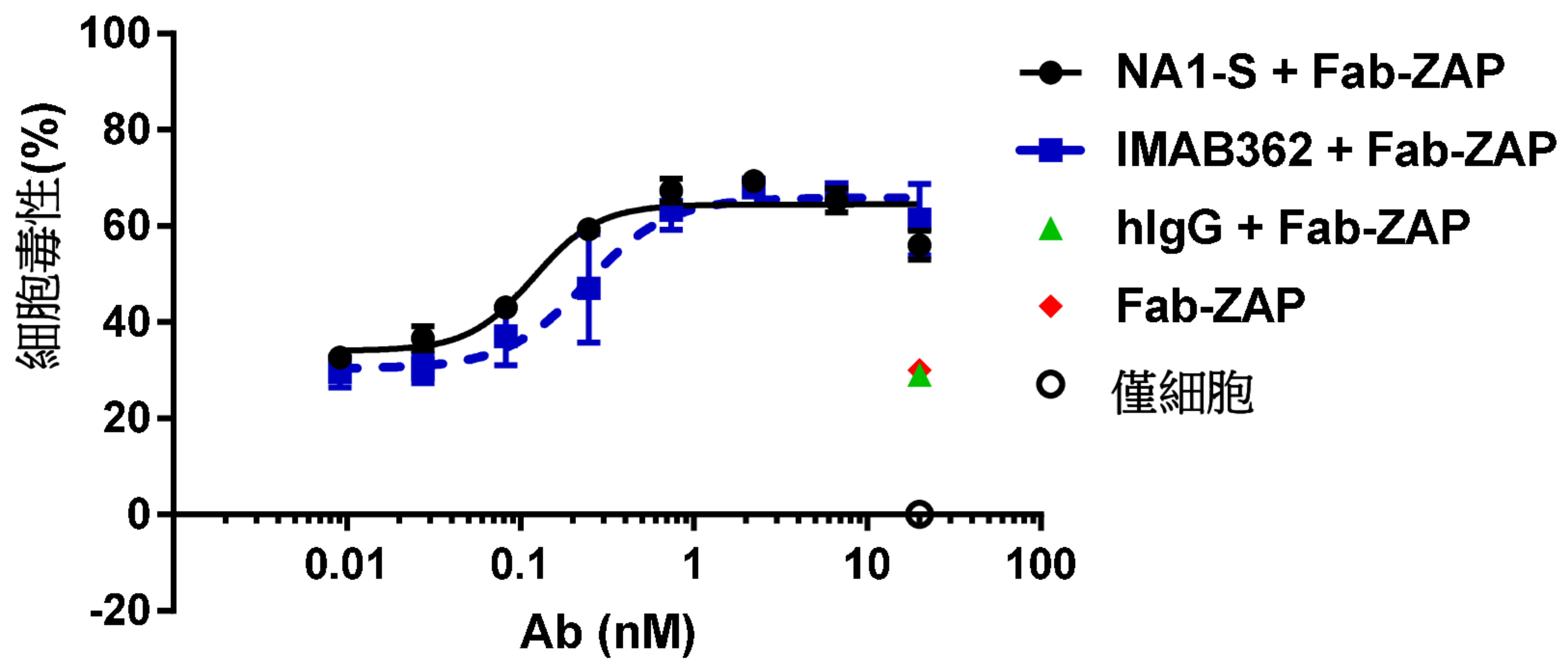


圖 11a

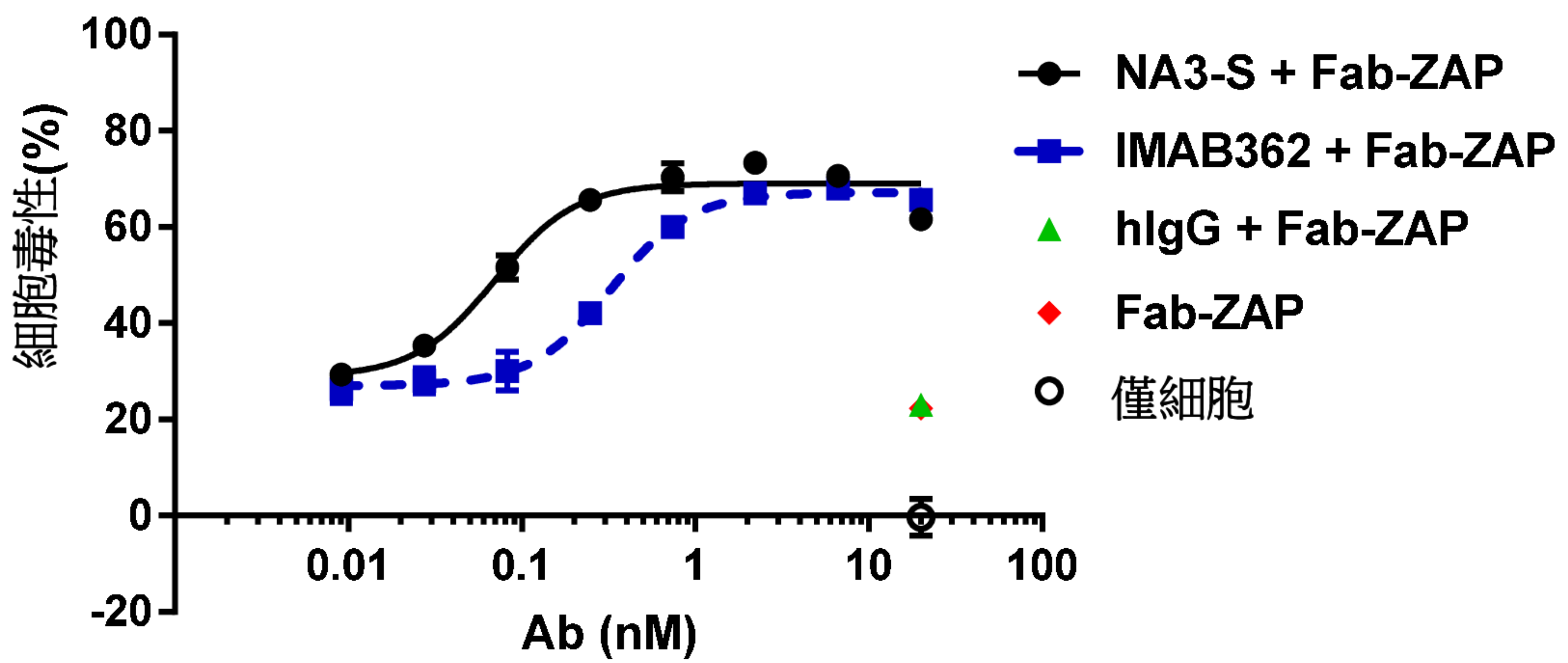


圖 11b

NA3-S 人源化前後在 CLDN18.2-HEK293T 細胞的結合試驗

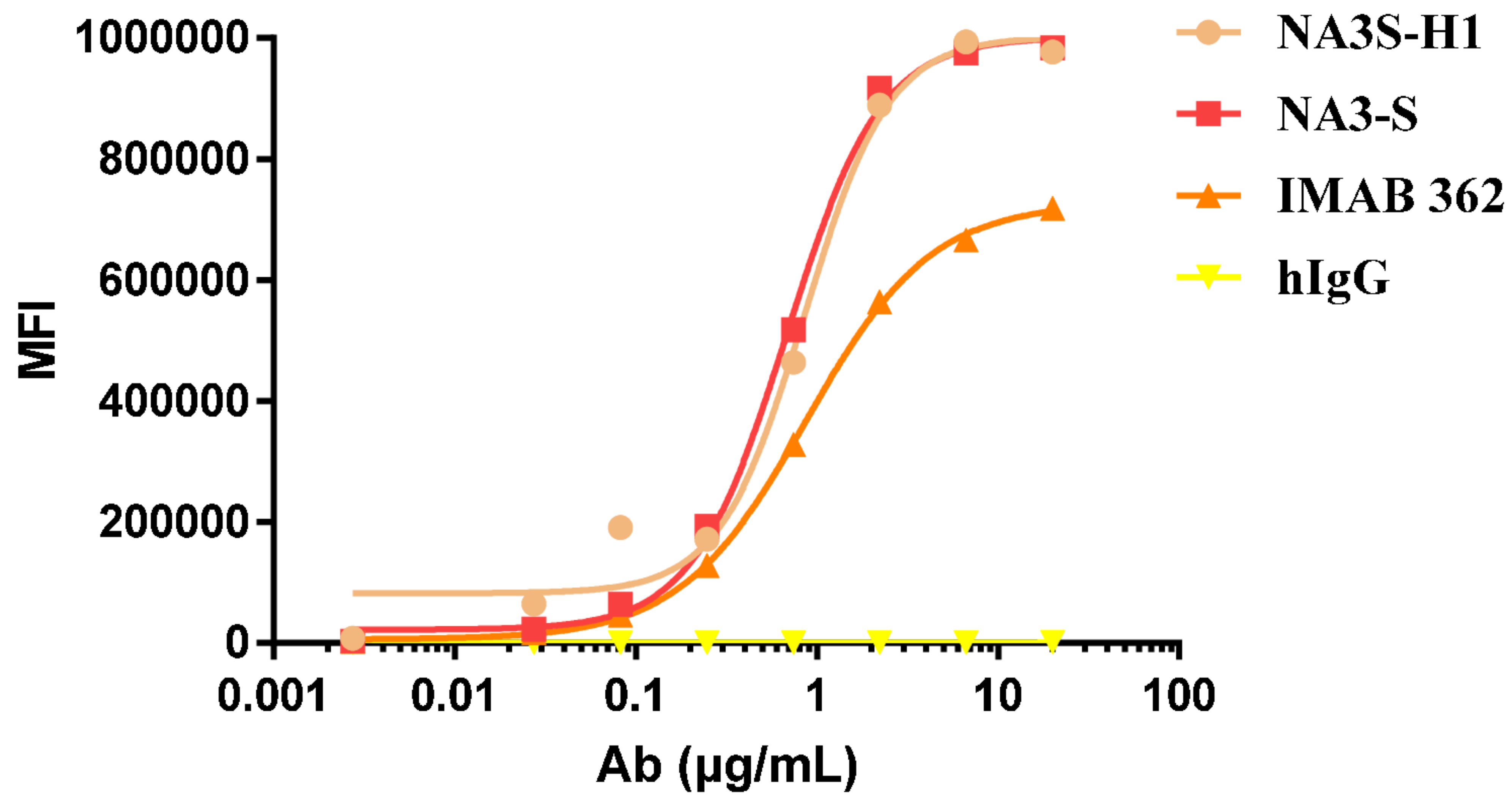


圖 12

不同濃度的 NA3S-H1 和 IMAB362 在 CLDN18.1-HEK293T 細胞上的結合

強度比較

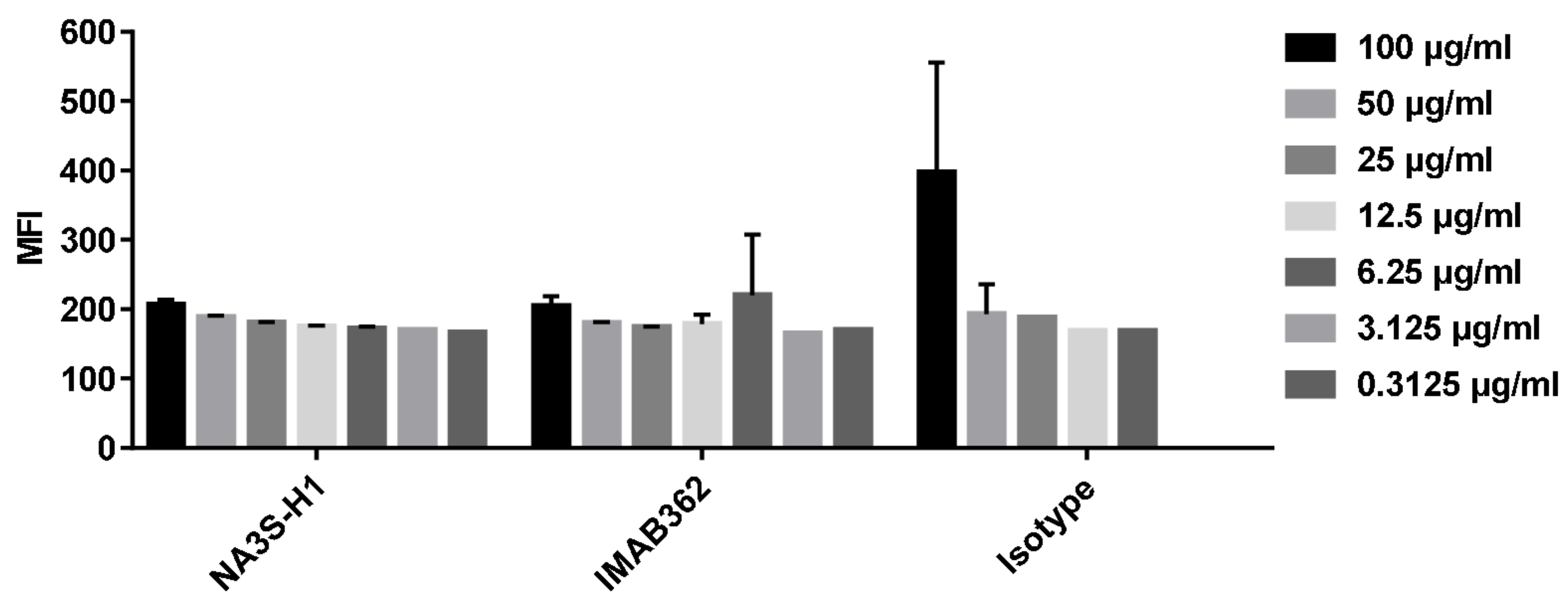


圖 13a

100 $\mu\text{g/ml}$ NA3S-H1 和 IMAB362 在 CLDN18.1-HEK293T 細胞上的細胞結合陽性率比較

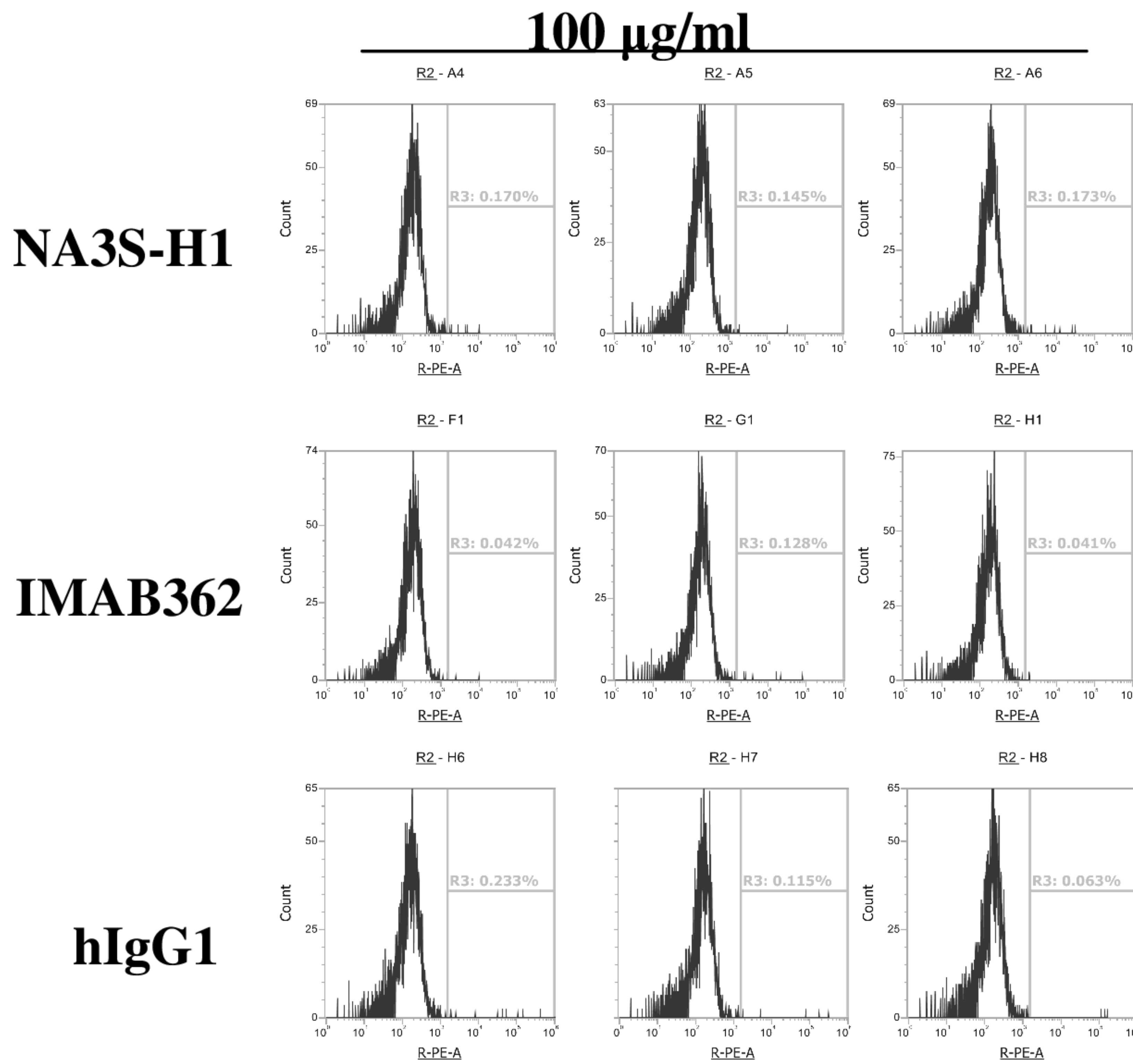


圖 13b

NA3S-H1 在人 CLDN18.2-KATOIII 胃癌細胞上的 CDC 細胞殺傷實驗

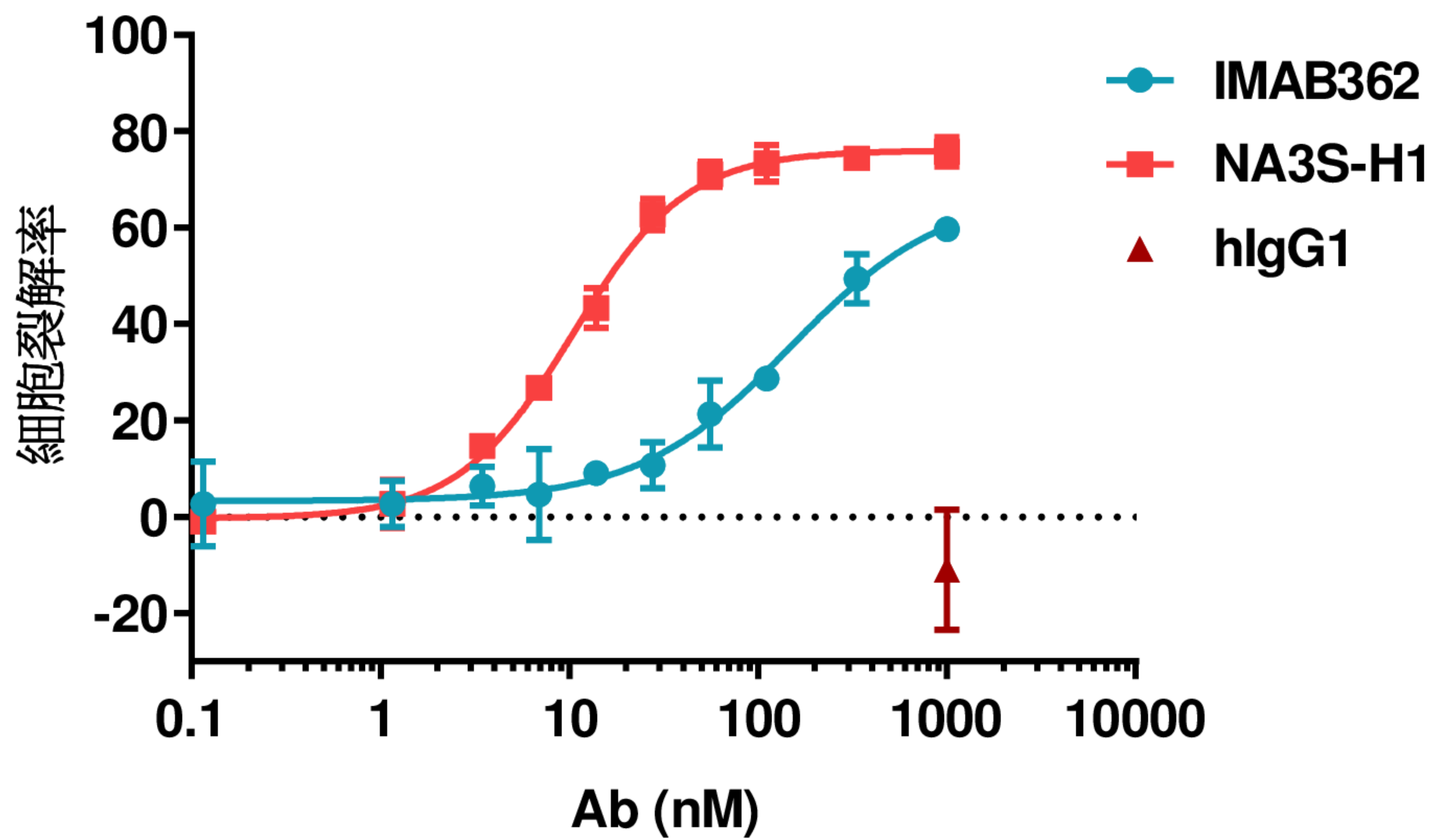


圖 14

NA3S-H1 在人 CLDN18.2-KATOIII 胃癌細胞上的 ADCC 細胞殺傷實驗

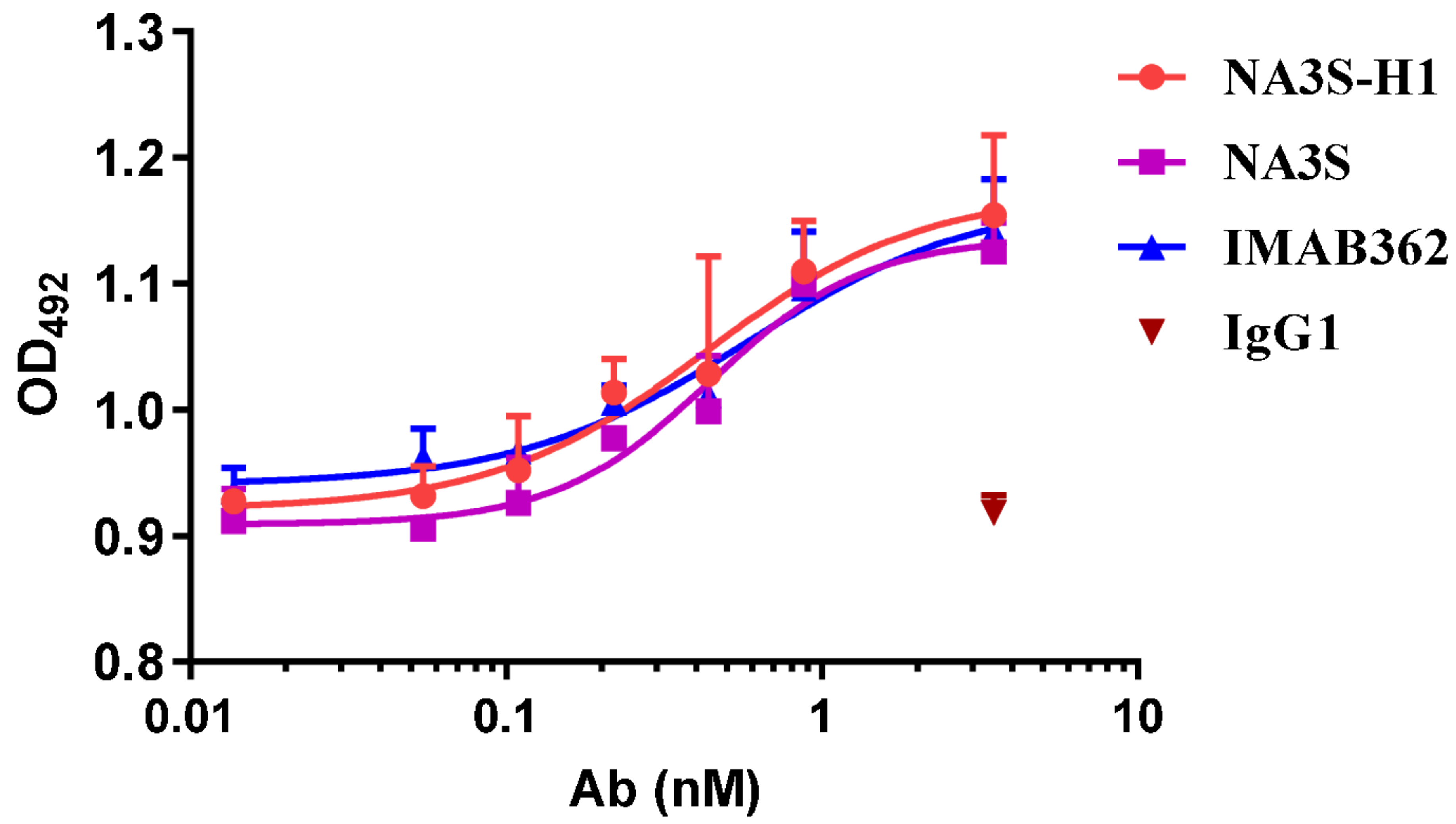


圖 15a

NA3S-H1 在人 CLDN18.2-HEK293T 細胞上的 ADCC 細胞殺傷實驗

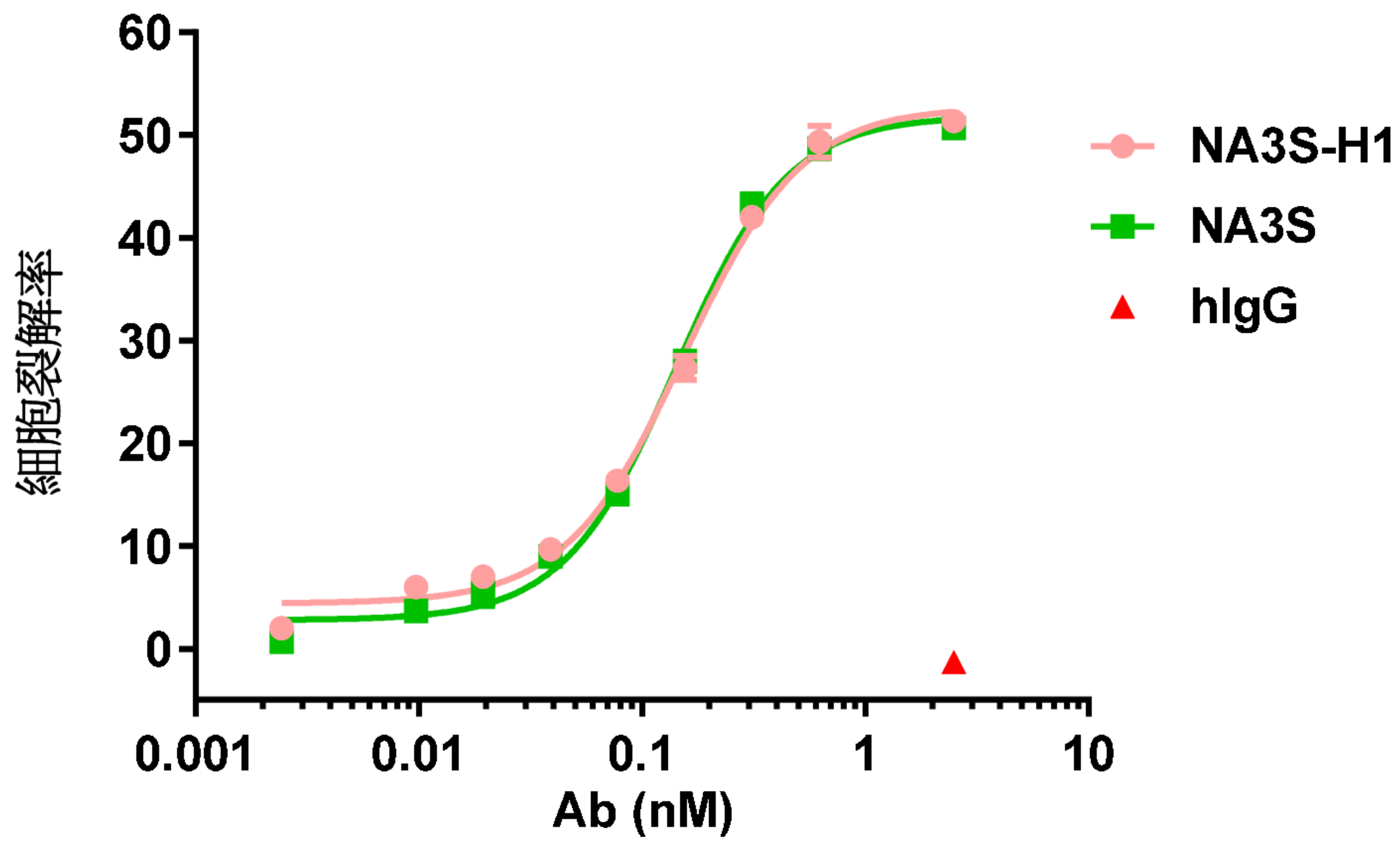


圖 15b