



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117940461 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 26

(21) 申请号 202280054980.6

(22) 申请日 2022.08.17

(66) 本国优先权数据

202110947802.3 2021.08.18 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.02.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/113031 2022.08.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/020537 ZH 2023.02.23

(71) 申请人 普米斯生物技术(珠海)有限公司

地址 519080 广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元

(72) 发明人 罗羿 陈俊颖 缪小牛 黄威峰

袁志军 彭绍岗 曾竣玮

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038

专利代理师 孔熹

(51) Int. Cl.

G07K 16/46 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

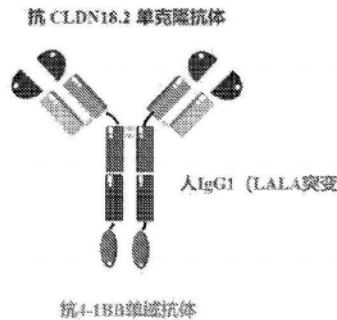
G01N 33/68 (2006.01)

(54) 发明名称

一种双特异性抗体及其用途

(57) 摘要

本申请涉及一种双特异性抗体及其用途,还涉及包含其的免疫缀合物和药物组合物。本申请还涉及双特异性抗体以及包含其的免疫缀合物和药物组合物的用途。本申请制备的双特异性抗体能够识别或结合表达Claudin 18.2的细胞和/或识别或结合表达4-1BB的细胞。并且,能够在受试者中预防和/或治疗肿瘤。



(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023年2月23日 (23.02.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/020537 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 16/46 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/113031
- (22) 国际申请日: 2022年8月17日 (17.08.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202110947802.3 2021年8月18日 (18.08.2021) CN
- (71) 申请人: 普米斯生物技术(珠海)有限公司(BIOTHEUS INC.) [CN/CN]; 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。
- (72) 发明人: 罗羿(LUO, Yi); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 陈俊颖(CHEN, Junying); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 缪小牛(MIAO, Xiaoniu); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 黄威峰(HUANG, Weifeng); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4

栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 袁志军(YUAN, Zhijun); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 彭绍岗(PENG, Shaogang); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 曾竣玮(TSUN, Andy); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。

- (74) 代理人: 中国贸促会专利商标事务所有限有限公司(CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市复兴门内大街158号远洋大厦F10层, Beijing 100031 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) Title: BISPECIFIC ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种双特异性抗体及其用途

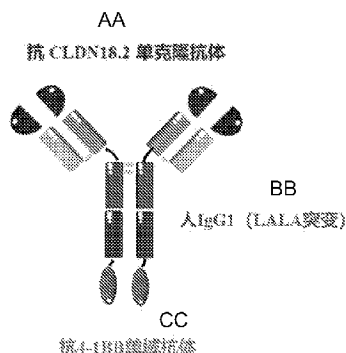


图1

AA Anti-CLDN18.2 monoclonal antibody
BB Human IgG1 (LALA mutation)
CC Anti-4-1BB single-domain antibody

(57) Abstract: The present application relates to a bispecific antibody and a use thereof, and also to an immunoconjugate and a pharmaceutical composition comprising the bispecific antibody. The present application further relates to uses of the bispecific antibody and the immunoconjugate and the pharmaceutical composition comprising the bispecific antibody. The bispecific antibody prepared in the present application can recognize or bind a cell expressing Claudin 18.2 and/or recognize or bind a cell expressing 4-1BB. Moreover, tumors can be prevented and/or treated in a subject.

(57) 摘要: 本申请涉及一种双特异性抗体及其用途, 还涉及包含其的免疫缀合物和药物组合物。本申请还涉及双特异性抗体以及包含其的免疫缀合物和药物组合物的用途。本申请制备的双特异性抗体能够识别或结合表达 Claudin 18.2 的细胞和/或识别或结合表达 4-1BB 的细胞。并且, 能够在受试者中预防和/或治疗肿瘤。

WO 2023/020537 A1

NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种双特异性抗体及其用途

技术领域

本申请属于生物医药技术领域，更具体地，本申请涉及一种双特异性抗体，以及包含其的免疫缀合物和药物组合物，本申请还涉及双特异性抗体以及包含其的免疫缀合物和药物组合物的用途。

背景技术

胃癌是全球最常见的癌症之一，2018 年报告的新诊断病例超过 100 万。我国是胃癌高发国家，据全国肿瘤登记中心最新数据估计，位居同期恶性肿瘤发病第 2 位。胃癌整体预后较差，5 年生存率仅 10%~30%，晚期胃癌患者 5 年生存率低于 10%。在正常组织中，Claudin-18 亚型 2 (Claudin 18.2) 仅在胃组织细胞中表达，是一种参与形成封闭小带的膜结合蛋白。然而，Claudin 18.2 在多种类型的肿瘤细胞中上调表达，包括胃癌和胰腺癌等。针对 Claudin 18.2 靶点的单克隆抗体药物 Zolbetuximab (IMAB362) 在临床研究中显示出了一定的疗效以及较小的毒性。

淋巴细胞表达多种共刺激受体，例如肿瘤坏死因子受体超家族中的 CD27、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134) 和 GITR (CD357) 等。这些受体在激活后可增强免疫效应和记忆反应。使用激动剂抗体靶向这些受体，可以有效地激活淋巴细胞，增强其抗肿瘤作用。4-1BB 作为其中一种重要的 T 细胞和 NK 细胞共刺激受体，其激动剂联合免疫检查点抑制剂在临床上以及临床前研究中均表现出良好的抗癌作用，尤其是在免疫原性较差的肿瘤中。但是，4-1BB 单抗激动剂（例如，Urelumab）的临床开发过程中观察到较为严重的靶向相关的肝脏毒性，证明了通过 4-1BB 受体系统性激活免疫细胞存在安全隐患。

因此，需要一种能够有效的激活免疫细胞抗肿瘤（例如，表达 Claudin 18.2 的肿瘤）作用同时能够消除可能存在的肝脏相关毒性的双特异性抗体。

发明内容

本申请的发明人经过大量实验和反复摸索，制备了一种双特异性抗体。通过肿瘤细胞表达的 Claudin 18.2 介导，特异性地激活免疫细胞 4-1BB 受体信号通路，从而既有效的激活了免疫细胞的抗肿瘤作用也同时消除了可能存在的系统性激活毒性。

因此，在第一方面，本申请提供了一种双特异性抗体，其包含 Claudin 18.2 结合实体和 4-1 BB 结合实体，其中，所述 Claudin 18.2 结合实体包含两对相同的免疫球蛋白链，其中，每一对免疫球蛋白链具有一条轻链和一条重链，所述重链包含重链可变区和重链恒定区；所述轻链包含轻链可变区和轻链恒定区；所述 4-1 BB 结合实体包含重链可变区；并且，所述 4-1 BB 结合实体的重链可变区与所述 Claudin 18.2 结合实体的重链的 C 末端连接；其中，

所述 Claudin 18.2 结合实体包含：如 SEQ ID NO: 1 所示的重链可变区（VH）中含有的 VH CDR1 或其变体、VH CDR2 或其变体以及 VH CDR3 或其变体；和/或，如 SEQ ID NO: 2 所示的轻链可变区（VL）中含有的 VL CDR1 或其变体、VL CDR2 或其变体以及 VL CDR3 或其变体；

所述 4-1 BB 结合实体包含：如 SEQ ID NO: 3 或 25 所示的重链可变区（VH）中含有的 VH CDR1 或其变体、VH CDR2 或其变体以及 VH CDR3 或其变体；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加，例如保守置换）。

在某些实施方案中，所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，所述 VH 中含有的 3 个 CDR 和/或所述 VL 中含有的 3 个 CDR 由 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义。

在某些实施方案中，如前所述的抗体或其抗原结合片段，其具有选自下列的一项或两项特征：

(1) 所述 Claudin 18.2 结合实体包含：

包含下述 3 个互补决定区（CDRs）的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO: 9 的 VH CDR1、序列为 SEQ ID NO: 10 的 VH CDR2、序列为 SEQ ID NO: 11 的 VH CDR3；和/或，包含下述 3 个互补决定区（CDRs）的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO: 12 的 VL CDR1、序列为 SEQ ID NO: 13 的 VL CDR2、序列为 SEQ ID NO: 14 的 VL CDR3；其中，所述 CDR 由 IMGT 编号系统定义；或

(2) 所述 4-1 BB 结合实体包含：

包含下述 3 个互补决定区（CDRs）的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO: 15 的 VH CDR1、序列为 SEQ ID NO: 16 的 VH CDR2、序列为 SEQ ID NO: 17 的 VH CDR3；其

中，所述 CDR 由 IMGT 编号系统定义。

在另一方面，本申请提供了一种双特异性抗体，其包含 Claudin 18.2 结合实体和 4-1 BB 结合实体，其中，所述 Claudin 18.2 结合实体包含两对相同的免疫球蛋白链，其中，每一对免疫球蛋白链具有一条轻链和一条重链，所述重链包含重链可变区和重链恒定区；所述轻链包含轻链可变区和轻链恒定区；所述 4-1 BB 结合实体包含重链可变区；并且，所述 4-1 BB 结合实体的重链可变区与所述 Claudin 18.2 结合实体的重链的 C 末端连接；

其中，所述 Claudin 18.2 结合实体的重链可变区（VH）包含下述 3 个互补决定区（CDR）：

(i) VH CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 9，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(ii) VH CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 10，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，和

(iii) VH CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 11，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；

所述 Claudin 18.2 结合实体的轻链可变区（VL）包含下述 3 个互补决定区（CDR）：

(iv) VL CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 12，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(v) VL CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 13，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，和

(vi) VL CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 14，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；

所述 4-1 BB 结合实体的重链可变区包含下述 3 个互补决定区（CDR）：

(vii) VH CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 15，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(viii) VH CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 16，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序

列，和

(ix) VH CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 17，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列。

在某些实施方案中，(i)-(ix)任一项中所述的 CDR 根据 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义。

在某些实施方案中，所述 Claudin 18.2 结合实体，其包含：如下 3 个重链 CDRs：序列为 SEQ ID NO: 9 的 VH CDR1，序列为 SEQ ID NO: 10 的 VH CDR2，序列为 SEQ ID NO: 11 的 VH CDR3；和/或，如下 3 个轻链 CDRs：序列为 SEQ ID NO: 12 的 VL CDR1，序列为 SEQ ID NO: 13 的 VL CDR2，序列为 SEQ ID NO: 14 的 VL CDR3。

在某些实施方案中，所述 4-1 BB 结合实体的重链可变区 (VH) 包含：如下 3 个重链 CDRs：序列为 SEQ ID NO: 15 的 VH CDR1，序列为 SEQ ID NO: 16 的 VH CDR2，序列为 SEQ ID NO: 17 的 VH CDR3。

在某些实施方案中，所述重链可变区还包含来源于人的框架区序列（例如，人免疫球蛋白）。

在某些实施方案中，所述 Claudin 18.2 结合实体包含：

(a) 重链可变区 (VH)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO: 1 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO: 1 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO: 1 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列；

和/或，

(b) 轻链可变区 (VL)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NO: 2 所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NO: 2 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或

(vi) 与 SEQ ID NO: 2 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至

少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列。

在某些实施方案中，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，所述 Claudin 18.2 结合实体包含：具有如 SEQ ID NO: 1 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的 VL。

在某些实施方案中，所述 4-1 BB 结合实体包含：

(a) 重链可变区 (VH)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO: 3 或 25 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO: 3 或 25 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO: 3 或 25 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列。

在某些实施方案中，(ii)中所述的置换是保守置换。

本申请的单域抗体不限于具体的生物来源或具体的制备方法。例如，本申请的单域抗体可以这样获得：(1)通过将天然存在的 VHH 结构域“人源化”或者通过表达编码这样的人源化 VHH 结构域的核酸；(2)应用合成或半合成技术制备蛋白、多肽或其它氨基酸序列；(3)通过应用核酸合成技术制备编码单域抗体的核酸，然后表达这样获得的核酸；和/或(4)通过前述的任何组合。

在某些实施方案中，所述 Claudin 18.2 结合实体还包含：

(a) 人免疫球蛋白的重链恒定区 (CH) 或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加（例如，至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）；和

(b) 人免疫球蛋白的轻链恒定区 (CL) 或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换（例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的保守置换）。

在某些实施方案中，所述重链恒定区是 IgG 重链恒定区，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区。

在某些实施方案中，所述轻链恒定区是 κ 或 λ 轻链恒定区。

在某些实施方案中，所述 Claudin 18.2 结合实体包含 SEQ ID NO: 8 所示的轻链恒定区 (CL)。

在某些实施方案中，所述双特异性抗体还包含不与 Fc 受体 (FcR) 结合的 Fc 片段；或者，包含具有降低的效应器功能的 Fc 片段，所述效应器功能为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、补体依赖的细胞毒性 (CDC) 或抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)。

在某些实施方案中，所述 Fc 片段选自下列的任意一项突变：

- (a) 具有 L235E 突变的 IgG1Fc 片段；
- (b) 具有 L234A 和/或 L235A 突变的 IgG1Fc 片段；
- (c) 具有 P329G 或 P329A 突变的 IgG1Fc 片段；
- (d) 具有 F234A 和/或 L235A 或 L235E 突变的 IgG4Fc 片段；
- (e) 具有 H268Q、V309L、A330S 和/或 P331S 突变的 IgG2Fc 片段；或
- (f) 具有 V234A、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S 和/或 P331S 突变的 IgG2Fc 片段。

在某些实施方案中，所述 Fc 片段为具有 L234A 和 L235A 突变的 IgG1Fc 片段。

在某些实施方案中，所述 Fc 片段具有 SEQ ID NO: 4 所示的序列。

在某些实施方案中，所述双特异性抗体还包含肽接头，并且，所述 Claudin 18.2 结合实体和 4-1 BB 结合实体通过肽接头连接。

在某些实施方案中，所述 Claudin 18.2 结合实体的重链恒定区的 C 端与 4-1 BB 结合实体的重链可变区的 N 端通过肽接头连接。

肽接头可以包含任何氨基酸，在某些实施方案中，肽接头包含甘氨酸 (G) 和丝氨酸 (S)。在某些实施方案中，肽接头的长度为 1-50 个氨基酸。肽连接体足够长以便能够提供足够的柔性程度，从而允许蛋白质适当地折叠。肽接头的长度、氨基酸组成可以很容易的由本领域技术人员选定。

在某些实施方案中，所述肽接头具有如 SEQ ID NO: 5 或 26 所示的序列。

现有技术中公开了多种双特异性抗体的制备方法，例如，US5989830 中公开了双特异

性抗体的制备方法，双特异性抗体片段分别由表达编码两个多肽链的双顺反子载体获得的，双特异性抗体的其中一个多肽链有两个通过肽接头串联的 VH（即，VH1-肽接头-VH2）。

在某些实施方案中，所述双特异性抗体的重链具有如 SEQ ID NO: 6, 27, 28 或 29 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述双特异性抗体的轻链具有如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

在第二方面，本申请提供一种分离的核酸分子，其编码如前所述的双特异性抗体，或其重链和/或轻链，或 Claudin 18.2 结合实体的重链可变区和/或轻链可变区，或 4-1 BB 结合实体的重链可变区。此类核酸分子不受限于其产生的方法，并且可以利用基因工程重组技术或化学合成方法获得。

在第三方面，本申请提供一种载体，其包含如前所述的分离的核酸分子。在某些实施方案中，所述载体为克隆载体或表达载体。在某些优选的实施方案中，本发明的载体是例如质粒，粘粒，噬菌体等等。

在第四方面，本申请提供一种宿主细胞，其包含如前所述的分离的核酸分子或如前所述的载体。此类宿主细胞包括但不限于，原核细胞例如大肠杆菌细胞，以及真核细胞例如酵母细胞，昆虫细胞，植物细胞和动物细胞（如哺乳动物细胞，例如小鼠细胞、人细胞等）。本发明的细胞还可以是细胞系，例如 HEK293 细胞。

在另一个方面，本申请还提供了制备本发明的双特异性抗体的方法，其包括，在合适的条件下培养本发明的宿主细胞，和从细胞培养物中回收本发明的 Claudin 18.2 结合实体和/或 4-1BB 结合实体。

任选地，通过肽接头连接所述 Claudin 18.2 结合实体和 4-1BB 结合实体。

在另一个方面，本发明提供了一种试剂盒，其包括本发明的双特异性抗体。在某些优选的实施方案中，本发明的双特异性抗体还包括可检测的标记。在某些优选的实施方案

中，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别本发明的双特异性抗体。在某些优选的实施方案中，所述第二抗体还包括可检测的标记。此类可检测的标记是本领域技术人员熟知的，包括但不限于，放射性同位素，荧光物质，发光物质，有色物质和酶（例如辣根过氧化物酶）等。

在第五方面，本申请提供一种免疫缀合物，其包含如前所述的双特异性抗体以及连接于所述双特异性抗体的治疗剂。

在某些实施方案中，所述治疗剂选自细胞毒剂。

在某些实施方案中，所述治疗剂选自烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂，及其任意组合。

在某些实施方案中，所述免疫缀合物是抗体-药物偶联物（ADC）。

在第六方面，本申请提供一种药物组合物，其含有如前所述的双特异性抗体或者如前所述的免疫缀合物，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在某些实施方案中，药物组合物还包含另外的药学活性剂。

在某些实施方案中，所述另外的药学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物，例如烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂、放射增敏剂、抗血管生成剂、细胞因子、分子靶向药物、免疫检查点抑制剂或溶瘤病毒。

在某些实施方案中，所述双特异性抗体或免疫缀合物与所述另外的药学活性剂作为分离的组分或作为同一组合物的组分提供。

在第七方面，本申请提供一种抑制表达 Claudin 18.2 的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞的方法，其包括将所述肿瘤细胞与有效量的如前所述的双特异性抗体，或如前所述的免疫缀合物，或如前所述的药物组合物接触。

在第八方面，本申请提供了如前所述的双特异性抗体，或如前所述的免疫缀合物在制备药物中的用途，所述药物用于在受试者（例如人）中预防和/治疗肿瘤。

在某些实施方案中，药物还包含另外的药学活性剂。

在某些实施方案中，所述另外的药学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物，例如烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂、放射增敏剂、抗血管生成剂、细胞因子、分子靶向药物、免疫检查点抑制剂或溶瘤病毒。

在某些实施方案中，所述肿瘤表达 Claudin 18.2。

在某些实施方案中，所述肿瘤涉及表达 Claudin 18.2 的肿瘤细胞。在某些实施方案中，所述 Claudin 18.2 在所述肿瘤细胞表面上表达。

在某些实施方案中，所述肿瘤选自胃癌、肝癌、胆道癌、肾细胞癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、卵巢癌、睾丸癌、子宫内膜癌、肺癌、食管癌、胰腺癌、支气管癌、乳腺癌、耳鼻喉(ENT)癌、结肠癌、头颈癌、胆囊癌。

在某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

在第九方面，本申请提供了如前所述的双特异性抗体，或如前所述的免疫缀合物，或如前所述的药物组合物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于：

- (1) 识别或结合表达 Claudin 18.2 的细胞；
- (2) 识别或结合表达 4-1BB 的细胞；
- (3) 激活细胞的 NF- κ B 信号通路；
- (4) 诱导细胞（例如，免疫细胞）激活杀伤肿瘤的活性；
- (5) 诱导细胞（例如，免疫细胞）分泌细胞因子（例如，IFN γ 和 IL-2）；
- (6) (1)-(5) 的任意组合。

在某些实施方案中，所述免疫细胞选自 B 细胞，T 细胞，NK 细胞。

术语定义

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的分子遗传学、核酸化学、化学、分子生物学、生物化学、细胞培养、微生物学、细胞生物学、基因组学和重组DNA等操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，术语“Claudin-18 (CLDN18)”是指位于细胞膜上的一个跨膜

蛋白。人类CLDN18基因的第一个外显子存在两个等位基因，可表达Claudin 18.1与Claudin 18.2两种不同的剪切突变体。Claudin 18.1与Claudin 18.2虽然结构极为相似，但其在正常组织和肿瘤中的表达均有差异。Claudin 18.2仅在胃黏膜组织中特异性表达，且Claudin 18.2在胃癌、食管癌、胰腺癌等癌种中表达发生上调。Claudin 18.2的表达不仅在原发性肿瘤中可检测到，还在肿瘤转移灶中大量表达。本领域技术人员可以通过公共数据库（例如，NCBI）获知Claudin 18.2的序列，例如参见，NCBI数据库中的序列号NP_001002026.1。在本文中，“Claudin 18.2”也可简称为“CLND18.2”。

如本文中所使用的，术语“4-1 BB”又称为CD137，属肿瘤坏死因子受体超家族成员(TNFRSF9)。主要表达于活化的T细胞，是T细胞协同刺激分子，其配体为4-1BBL，二者结合可刺激T细胞活化和增殖。本领域技术人员可以通过公共数据库（例如，NCBI）获知4-1BB的序列，例如参见，NCBI数据库中的序列号NP_001552.2。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指，通常由两对多肽链（每对具有一条轻链(LC)和一条重链(HC)）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ (kappa)和 λ (lambda)轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由3个结构域(CH1、CH2和CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应子功能，如可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH和VL区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各VH和VL由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成。各重链/轻链对的可变区(VH和VL)分别形成抗原结合部位。氨基酸在各区域或结构域的分配可遵循Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia等人 (1989) Nature 342:878-883的定义。

如本文中所使用的，术语“单域抗体(single domain antibody, sdAb)”、“结

构域抗体”与“纳米抗体(nanobody)”可互换使用，其是指由抗体中单个可变结构域(例如重链可变区)所组成的抗体片段。典型地，单域抗体、结构域抗体或纳米抗体由4个构架区和3个互补性决定区组成，所述4个构架区分别为FR1-FR4，所述3个互补性决定区分别为CDR1-CDR3。在某些实施方案中，本申请的单域抗体可以具有FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的结构。这些抗体不需要轻链可变区即可以高亲和力和特异性与抗原结合。与重链和轻链组成的抗体相比，纳米抗体可溶度高，对热、pH、蛋白酶和其它变形剂稳定度高，只需单链表达便于大规模生产。

如本文中所使用的，术语“双特异性抗体”是指其由第一抗体(或其片段)和第二抗体(或其片段)或抗体类似物通过偶联臂所形成的偶联物，偶联的方式包括但不限于化学反应、基因融合和酶促。双特异性抗体可通过各种方法连接或产生，例如参见 Songsivilai 等人的方法(Clin. Exp. Immunol., 79:315-321(1990))，以及 Kostelny 等人的方法(J. Immunol., 148:1547-1553(1992))。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，经基因工程改造的非人源抗体，其氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。通常而言，人源化抗体的全部或部分CDR区来自于非人源抗体(供体抗体)，全部或部分的非CDR区(例如，FR)来自于人源免疫球蛋白(受体抗体)。人源化抗体通常保留了供体抗体的预期性质，包括但不限于，抗原特异性、亲和性、反应性、提高免疫细胞活性的能力、增强免疫应答的能力等。供体抗体可以是有预期性质(例如，抗原特异性、亲和性、反应性、提高免疫细胞活性的能力和/或增强免疫应答的能力)的驼源抗体。

如本文中所使用的，术语“结合实体”是指特异性结合靶抗原的任何单体或多聚体蛋白或蛋白片段。术语“结合实体”包括但不限于抗体或其结合部分，诸如免疫功能片段。

如本文中所使用的，术语“肽接头”是指经过调整能够连接抗体结合实体的肽。

如本文中所使用的，术语“免疫球蛋白”是指由一种或多种通过免疫球蛋白基因编码的多肽组成的蛋白质。免疫球蛋白构成抗体的基础结构单元。抗体通常为四聚体且由两对相同的免疫球蛋白链组成，每一对免疫球蛋白链具有一条轻链及一条重链。在每一对免疫球蛋白链中，轻链及重链可变区一起负责抗原结合，且恒定区负责抗体效应物功能。

如本文中所使用的，免疫球蛋白的“轻链”可分类为 κ (kappa) 和 λ (lambda) 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。

如本文中所使用的，术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区中负责抗原结合的氨基酸残基。在重链和轻链的可变区中各含有三个 CDR，命名为 CDR1、CDR2 和 CDR3。这些 CDR 的精确边界可根据本领域已知的各种编号系统进行定义，例如可按照 Kabat 编号系统（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991）、Chothia 编号系统（Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883）或 IMGT 编号系统（Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003）中的定义。对于给定的抗体，本领域技术人员将容易地鉴别各编号系统所定义的 CDR。并且，不同编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的（例如，可参见 Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003）。

如本文中所使用的，术语“构架区（framework region）”或“FR”残基是指，抗体可变区中除了如上定义的 CDR 残基以外的那些氨基酸残基。

如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”、“单抗”、“mAb”具有相同的含义且可互换使用可互换，其是指，来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段，也即，除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。此外，修饰语“单克隆”仅表明该抗体的特征为从高度同源的抗体群中获得，不能理解为需要通过任何特定方法来制备所述抗体。

本发明的单克隆抗体可以通过多种技术进行制备，例如杂交瘤技术（参见，例如 Kohler 等人. Nature, 256:495, 1975），重组 DNA 技术（参见，例如美国专利申请 4,816,567），或噬菌体抗体库技术（参见，例如 Clackson 等. Nature 352 : 624-628, 1991，或 Marks 等. J. Mol. Biol. 222 : 581-597, 1991）。

如本文中使用的，术语“受试者”是指哺乳动物，例如灵长类哺乳动物，例如人。在某些实施方式中，所述受试者（例如人）患有肿瘤（例如表达 CLDN6 和/或 CLDN9 的肿瘤），或者，具有患有上述疾病的风险。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如，肿瘤）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病（例如，肿瘤）的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾

病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

如本文中所使用的，术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时（例如，两个 DNA 分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据，或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据），那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目 $\times 100$ 的函数。例如，如果两个序列的 10 个位置中有 6 个匹配，那么这两个序列具有 60% 的同一性。例如，DNA 序列 CTGACT 和 CAGGTT 共有 50% 的同一性（总共 6 个位置中有 3 个位置匹配）。通常，在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。这样的比对可通过使用，例如，可通过计算机程序例如 Align 程序 (DNASTAR, Inc.) 方便地进行的 Needleman 等人 (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453 的方法来实现。还可使用已整合入 ALIGN 程序 (版本 2.0) 的 E. Meyers 和 W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) 的算法，使用 PAM120 权重残基表 (weight residue table)、12 的缺口长度罚分和 4 的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外，可使用已整合入 GCG 软件包 (可在 www.gcg.com 上获得) 的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) 算法，使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵以及 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重 (gap weight) 和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。

如本文中所使用的，术语“保守置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换。例如，可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和 PCR 介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换，例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似 (例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质，包括形成共价键或氢键的能力等) 的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链 (例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链 (例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链 (例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、

非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分支侧链(例如, 苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如, 酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此, 优选来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见, 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 .NatlAcad .Set USA* 94:412-417(1997), 其通过引用并入本文)。

如本文中所使用的, 术语“L234A 突变”是指将天然的 Fc 片段的第 234 位氨基酸由 L 突变为 A。同理的, “L235A 突变”是指将天然的 Fc 片段的第 235 位氨基酸由 L 突变为 A。

发明的有益效果

与现有技术相比, 本申请制备的双特异性抗体能够识别或结合表达 Claudin 18.2 的细胞和/或识别或结合表达 4-1BB 的细胞。并且, 能够激活细胞的 NF- κ B 信号通路, 诱导细胞激活杀伤肿瘤的活性, 还能够诱导细胞分泌细胞因子(例如, IFN γ 和 IL-2), 并能够在受试者中预防和/或治疗肿瘤。并且, 该双特异性抗体与市售成品单抗或联合使用的单抗相比, 具有更突出的预防和/或治疗肿瘤的作用。

另外, 本申请与 4-1BB 单抗相比, 降低了肝脏相关靶向效应。通过使用肿瘤相关抗原(TAA) Claudin 18.2 来交联缺乏 Fc 受体(FcR)结合特性的 4-1BB 受体, 实现了无 4-1BB 相关毒性的靶向抗肿瘤功效。同时本申请设计了 Fc 域, 能够有效去除或降低 FcR 结合, 限制 Fc 介导的生物学活性。

下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述, 但是本领域技术人员将理解, 下列附图和实施例仅用于说明本发明, 而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述, 本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得显然。

附图说明

图 1 显示了本申请抗 Claudin 18.2 和 4-1 BB 的双特异性抗体的示意图。

图 2 显示了本申请的双特异性抗体与 Claudin 18.2 的结合结果。其中，图 2A 显示了本申请的双特异性抗体与 NUGC4 细胞自身表达的 Claudin 18.2 的结合结果；图 2B 显示了本申请的双特异性抗体与 MC38 细胞过表达的人 Claudin 18.2 的结合结果；其中，Claudin 18.2×4-1BB biAb 为本申请的双特异性抗体，4-1BB sdAb 为 4-1BB 单域抗体，Claudin 18.2 mAb 为 Claudin 18.2 单抗。

图 3 显示了本申请的双特异性抗体与 CHO 细胞过表达的人 4-1BB 的结合结果；其中，Claudin 18.2×4-1BB biAb 为本申请的双特异性抗体，4-1BB sdAb 为 4-1BB 单域抗体，Claudin 18.2 mAb 为 Claudin 18.2 单抗，Urelumab 为 4-1BB 的单抗。

图 4 显示了本申请的双特异性抗体激活 Jurkat 细胞 NF- κ B 信号通路的结果；其中，Claudin 18.2×4-1BB biAb 为本申请的双特异性抗体，4-1BB sdAb 为 4-1BB 单域抗体，Claudin 18.2 mAb 为 Claudin 18.2 单抗，Urelumab 为 4-1BB 的单抗。

图 5 显示了本申请的双特异性抗体诱导外周血单个核细胞（PBMC）对于 Claudin 18.2 阳性肿瘤细胞 NUGC4 的杀伤结果；其中，Claudin 18.2×4-1BB biAb 为本申请的双特异性抗体，4-1BB sdAb 为 4-1BB 单域抗体，Urelumab 为 4-1BB 的单抗。

图 6 显示了本申请的双特异性抗体诱导 PBMC 的细胞因子释放的结果，图 6A 为细胞因子 IFN γ 释放的结果，图 6B 为细胞因子 IL-2 释放的结果；其中，Claudin 18.2×4-1BB biAb 为本申请的双特异性抗体，4-1BB sdAb 为 4-1BB 单域抗体，Urelumab 为 4-1BB 的单抗，Neg Ctrl 为阴性对照。

图 7 显示了本申请的双特异性抗体对肿瘤抑制活性的测试结果。其中，PBS 为阴性对照，Claudin 18.2×4-1BB biAb 为本申请的双特异性抗体，IMAB362 为 Claudin 18.2 单抗，Claudin 18.2 mAb + 4-1BB sdAb 为构建本申请双抗的两种抗体的联合给药。

图 8 显示了本申请的双特异性抗体对肿瘤抑制记忆效应的测试结果。其中，PBS 为阴性对照，Claudin 18.2×4-1BB biAb 为本申请不同浓度的双特异性抗体，PBS in new 4-1BB KI mice 为再次肿瘤接种时的阴性对照。

序列信息

本发明涉及的部分序列的信息提供于下面的表 1 中。

表 1：序列的描述

SEQ ID NO:	描述	序列
1	anti- Claudin 18.2 mAb 重链可变区	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYMHVWRQAPGQGLEWMGTIYPGNG DTSYNQKFQGRVTMTRDKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYFCARGGYYGNSLDYWGQG TLVTVSS
2	anti- Claudin 18.2 mAb 轻链可变区	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNAYYYPTFGQGTKLEI K
3	单域抗体 HZ-L-Yr-16-1-AB20ME 的 4-1BB 重链可变区	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAMGWYRQAPGKQRELVASIITGDG DTNYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDAVYYCYARTGEGSSWLEGHEY DYWGQGTQVTVSS
4	人 IgG1 Fc 氨基酸序列	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
5	柔性肽序列-1	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
6	双特异性抗体 Claudin 18.2x4-1BB biAb 重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYMHVWRQAPGQGLEWMGTIYPGNG DTSYNQKFQGRVTMTRDKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYFCARGGYYGNSLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGSGGGSGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAMG WYRQAPGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDT AVYYCYARTGEGSSWLEGHEYDYWGQGTQVTVSS
7	双特异性抗体 Claudin 18.2x4-1BB biAb 轻链	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNAYYYPTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSITLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
8	人 κ 轻链恒定区 (CL) 氨基酸序列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSITLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
9	anti- Claudin 18.2 mAb VH CDR1	GYTFTSYY
10	anti- Claudin 18.2 mAb VH CDR2	IYPGNGDT
11	anti- Claudin	ARGGYYGNSLDY

	18.2 mAb VH CDR3	
12	anti-Claudin 18.2 mAb VL CDR1	QSVLSSGNQKNY
13	anti-Claudin 18.2 mAb VL CDR2	WAS
14	anti-Claudin 18.2 mAb VL CDR3	QNAYYYPFT
15	HZ-L-Yr-16-1-AB20ME VH CDR1	GSTFSIVA
16	HZ-L-Yr-16-1-AB20ME VH CDR2	IITGDGDT
17	HZ-L-Yr-16-1-AB20ME VH CDR3	YARTGEGSSWLEGHEYDY
18	编码双特异性抗体重链的核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAA GGTGTCTCTGCAAGGCTCCGGCTACACCTTTACCAGCTACTACATGCACTGGGTCC GACAGGCCCTGGACAAGGATTGGAGTGGATGGGCACCATCTATCCCGGAACGGC GACACCTCCTACAACCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATGACCAGAGACAAGTC CACCTCCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCCGAGGATAACGCCGTGT ACTTCTGTGCCAGAGCGGCTACTACGGCAACTCCCTGGATTATTGGGGCCAGGGC ACACTGGTCACCGTGTCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTCCCTCTGGC TCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGG ACTACTTTCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGAACTCTGGCGCTCTGACATCCGGC GTGCACACATTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCTCTGT CGTGACCGTGCCTTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACC ACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTCGGACAAG ACCCACACCTGTCTCCATGTCTCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTT TCTGTTCCCTCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGA CCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC GTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAA CTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGATTGGCTGAACG GCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCTATCGAAAAG ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCCAGGTTTACACCCTGCCTCC AAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCT TCTACCCCTCCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAAC TACAAGACAACCCCTCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAA GCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGTCTGTGA TGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTGTCCCTGGC AAAGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGCGGAGGCGGTTCTGGTGGTGG

		<p>CGGATCTCAAGTTCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGAGTGGTTCAGCCTGGAAGAT CCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCTTCTGGCTCCACCTTCAGCATCGTTGCCATGGGC TGGTACAGACAGGCTCCTGGCAAACAGCGAGAGCTGGTGGCCTCTATCATTACCGG CGACGGCGATACCAACTACGCCGACTCTGTGAAAGGCCGGTTCACCATCTCTCGGG ACAACTCCAAGAACACCATGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAAGCTGAGGATACA GCTGTCTACTACTGCTACGCCAGAACCGGCGAGGGATCCTCTTGGCTGGAGGGCCA CGAGTACGACTACTGGGGACAGGGAACACAAGTGACAGTGTCTCTCC</p>
<p>19</p>	<p>编码双特异性 抗体轻链的核 苷酸序列</p>	<p>GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCTCTGGCCGTGTCTCTGGGCGAGAGAGC CACCATCAACTGCAAGTCTCTCAGTCCGTGCTGTCTCCGGCAACCAGAAGAATT ACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTACTGG GCCTCCACCAGAGAATCTGGCGTGCCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCAC CGACTTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACT GTCAGAACGCCTACTACTACCCCTTACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATC AAGAGAACCCTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCACCTTCCGACGAGCAGCT GAAGTCCGGCACAGCTTCTGTGCTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCTCGGGAAG CCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAAGAGTCT GTGACCGAGCAGGACTCTAAGGACTCCACCTACAGCCTGTCTCCACACTGACCCT GTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCCTGCGAAGTGACCCATCAGG GCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGT</p>
<p>20</p>	<p>编码 Urelumab 单抗重链的核 苷酸序列</p>	<p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCCGACTGCTGAAGCCAAGCGAAACTGAG CCTGACCTGCGCGTCTACGGAGGATCCTTTTCAGGATACTATTGGAGCTGGATCA GACAGTCCCCGAAAAGGGCCTGGAGTGGATCGGAGAGATTAACCACGGAGGATAC GTGACCTACAACCCAGCCTGGAGAGCAGAGTGACCATCAGTGTGGACACCTCAA GAACCAGTTTAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCGACACCGCAGTCTACT ACTGCGCTAGAGACTACGGCCAGGCAACTACGACTGGTACTTCGACCTGTGGGGC AGAGGCACCCTGGTGACAGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTC CCTGGCCCTTGTTCAGAAGCACATCCGAGTCCACCGCCGCTGGGCTGTCTGG TGAAGGATTACTTTCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAACAGCGGCGCCCTGACA TCCGGCGTGACACCTTCCCCGCGTGTGCAGTCTCCGGCCTGTACAGCCTGAG CAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCAAGACATACCTGTAACG TGGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGATAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGC CCCCCTTGCCCCCTGCCCTGCTCCTGAGTTCCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCT GTTCCCCCTAAGCCCAAGGACACACTGATGATCTCCAGAACCCCCGAGGTGACCT GTGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAGACCCTGAGGTGCAGTTAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGACAATGCCAAGACAAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAACTC CACATACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCA AGGAGTACAAGTGTAAAGTGAGCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAGACC ATCTCCAAGGCCAAGGGCAGCCAGGGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCTAG CCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCT ACCCTTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCCGAGAATAACTAC AAGACAACCCCTCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCCTTTTTCTGTACAGCAGGCT GACAGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGCAACGTGTTAGCTGTAGCGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCCCTGGGC</p>

<p>21</p>	<p>编码 Urelumab 单抗轻链的核苷酸序列</p>	<p>GAGATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGCCACACTGAGTCTGAGTCCCGGCGAGAGAGC AACACTGAGTTGTAGGCAAGCCAGAGCGTGAGTAGCTACCTGGCCTGGTACCAGC AGAAGCCCCGCCAGGCCCCAGACTGCTGATTTACGACGCCTCCAACAGAGCAACC GGAATCCCCGCCAGATTCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTACCCTGACTAT CAGCAGCCTGGAACCCGAGGATTTGCGCGTCTACTACTGCCAGCAGCGCAGCAACT GGCCCCCGCTCTGACCTTCGGAGGAGGCACAAAGGTGAAATCAAGCGAACTGTG GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGA CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGC CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC</p>
<p>22</p>	<p>编码 4-1BB 单域抗体重链的核苷酸序列</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGAGTGGTGCAGCCTGGCAGATCTCTGAG ACTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTCCACCTTTTCTATCGTGGCTATGGGCTGGTACA GACAGGCCCTGGCAAACAGAGAGAGCTGGTCGCTCTATCATTACCGGCAGCGC GATACCAACTACGCCACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACCTC CAAGAACACCATGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAAGCCTGAGGACACCGCCGTGT ACTACTGCTACGCTAGAACCGGCGAGGGCTCCTCTTGGCTGGAAGGCCACGAGTAC GATTATTGGGGCCAGGGCACCCAAGTACCCTGTCTCTGACAAGACCCACACCTG TCCTCCATGTCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTC CAAAGCCTAAGGATACCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG GTGGATGTGTCTCAGGAGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACA GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTAC AAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCTATCGAAAAGACCATCTCCAA GGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCCAGGTTTACACCCTGCCTCCAAGCCGGGAAG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCC GACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACCTACAAGACAAC CCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGCTACTCCAAGCTGACAGTGG ACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCC CTGCACAATCACTACACCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCTGGCAAG</p>
<p>23</p>	<p>编码 Claudin 18.2 单抗重链的核苷酸序列</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAAAGCCCGGCCAGCGTGAA GGTGAGCTGCAAGGCCAGCGCTACACCTTACCAGCTACTACATGCACTGGGTGA GACAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCACCATCTACCCGGCAACGGC GACACCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAGAGTGACCATGACCAGAGACAAGAG CACCAGCACCCTGTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGT ACTTCTGCGCCAGAGCGGCTACTACGGCAACAGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGC ACCCTCCTCCAAGAGCCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGT GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA</p>

		ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAA ACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT AAA
24	编码 Claudin 18.2 单抗轻链 的核苷酸序列	GACATTGTGATGACCCAGAGCCCCGACTCCCTGGCCGTGAGCCTGGGAGAAAGAGC CACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGAGCAGCGGCAACCAGAAAACT ACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGG GCCAGCACCAGAGAGAGCGGCGTGCCCGACAGATTCAGCGGCAGCGCAGCGGCAC CGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACT GCCAGAACGCCTACTACTACCCCTTACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATC AAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCT GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTCGGAAGTACCCATCAGG GCCTGAGTTCGCCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
25	单域抗体 HZ- L-Yr-16-1- AB24ME 的 4- 1BB 重链可变 区	QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGSTFSIVAMGWYRQAPGKQRELVASIITGDG DTNYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYARTGYSSELEGHEY DYWGQGTQVTVSS
26	柔性肽序列-2	GGGGSGGGSGGGSGGGGSG
27	双特异性抗体 Claudin 18.2x4-1BB biAb 重链-2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGTIYPGNG DTSYNQKFQGRVTMTRDKSTSTVYMELSSLRSED TAVYFCARGGYGNSLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGSGGGSGGGSGGGSGQVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGSTFSIVAM GWYRQAPGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPED TAVYYCYARTGEGSSWLEGHEYDYWGQGTQVTVSS
28	双特异性抗体 Claudin	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGTIYPGNG

	<p>18. 2x4-1BB biAb 重链-3</p>	<p>DTSYNQKFQGRVTMTRDKSTSTVYMELSSLRSED TAVYFCARGGYYGNSLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAM GWYRQAPGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKPED TAVYYCYARTGYSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS</p>
<p>29</p>	<p>双特异性抗体 Claudin 18. 2x4-1BB biAb 重链-4</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTSYMHWRQAPGQGLEWMGTIYPGNG DTSYNQKFQGRVTMTRDKSTSTVYMELSSLRSED TAVYFCARGGYYGNSLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAMG WYRQAPGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKPEDT AVYYCYARTGYSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS</p>

具体实施方式

现参照下列意在举例说明本发明（而非限定本发明）的实施例来描述本发明。

除非特别指明，否则基本上按照本领域内熟知的以及在各种参考文献中描述的常规方法进行实施例中描述的实验和方法。例如，本发明中所使用的免疫学、生物化学、化学、分子生物学、微生物学、细胞生物学、基因组学和重组 DNA 等常规技术，可参见萨姆布鲁克(Sambrook)、弗里奇(Fritsch)和马尼亚蒂斯(Maniatis)，《分子克隆：实验室手册》(MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL)，第 2 次编辑(1989)；《当代分子生物学实验手册》(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY)(F. M. 奥苏贝尔(F. M. Ausubel)等人编辑，(1987))；《酶学方法》(METHODS IN ENZYMOLOGY)系列(学术出版公司)；《PCR 2：实用方法》(PCR 2:A PRACTICAL APPROACH)(M. J. 麦克弗森(M. J. MacPherson)、B. D. 黑姆斯(B. D. Hames)和 G. R. 泰勒(G. R. Taylor)编辑(1995))，以及《动物细胞培养》(ANIMAL CELL CULTURE)(R. I. 弗雷谢尼(R. I. Freshney)编辑(1987))。

另外，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所

用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。本领域技术人员知晓，实施例以举例方式描述本发明，且不意欲限制本发明所要求保护的范围。本文中提及的全部公开案和其他参考资料以其全文通过引用合并入本文。

实施例 1. 抗 Claudin 18.2 x 4-1BB 双特异性抗体的克隆和表达

在本实施例中，构建了抗 Claudin 18.2×4-1BB 双特异性抗体 (biAb)。Claudin 18.2x4-1BB biAb 由 2 条多肽链组成，其结构示意图如图 1 所示。该双特异性抗体的重链具有 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列，其包含抗 claudin18 isoform 2 (Claudin 18.2) 的单克隆抗体 anti- Claudin 18.2 mAb 的重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1)、人 IgG1 Fc 的氨基酸序列 (引入 LALA 突变以降低 Fc 功能, SEQ ID NO: 4)、柔性肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 5) 以及抗 4-1BB 的单域抗体的 4-1BB 结合区域的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 3)。其中，抗 4-1BB 的单域抗体的 4-1BB 重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 3) 的 N 端通过柔性肽 (SEQ ID NO: 5) 连接于 Fc 的 C 端。

该双特异性抗体的轻链具有 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列，其包含抗 claudin18 isoform2 的单克隆抗体 anti- Claudin 18.2 mAb 的轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2)，以及在所述 VL 氨基酸序列 C 端的人 κ 轻链恒定区 (CL) 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 8)。

采用 ExpiCHO™ 表达系统试剂盒 (购自 Thermo)，将含有编码抗体重链和轻链氨基酸序列 (双特异性抗体 Claudin 18.2x4-1BB biAb 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示，双特异性抗体 Claudin 18.2x4-1BB biAb 轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示) 的核苷酸序列的抗体表达质粒分别转入 Expi-CHO 细胞中，转染方法按照商品说明书，细胞培养 5 天后收集上清利用蛋白 A 磁珠 (购自金斯瑞) 分选法纯化目的蛋白。将磁珠用适当体积的结合缓冲液 (PBS+0.1%吐温 20, pH 7.4) 重悬 (1-4 倍磁珠体积) 后加入至待纯化样品中，室温孵育 1 小时，期间温柔振荡。样品置于磁力架上 (购自海狸)，弃去上清，磁珠用结合缓冲液清洗 3 遍。按照磁珠体积的 3-5 倍体积加入洗脱缓冲液 (0.1M sodium citrate, pH 3.2) 室温振荡 5-10 min，置回磁力架上，收集洗脱缓冲液，转移至已加入中和缓冲液 (1M Tris, pH 8.54) 的收集管中混匀。由此获得本申请的双特异性抗体。

采用 ExpiCHO™ 表达系统试剂盒 (购自 Thermo)，将含有编码抗体重链和轻链的核苷酸序列 (编码 Urelumab 单抗重链和轻链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO:

21 所示；编码 4-1BB 单域抗体重链的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示；编码 Claudin 18.2 重链和轻链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 23 和 SEQ ID NO: 24 所示）的表达质粒转入 Expi-CHO 细胞中，转染方法按照商品说明书，细胞培养 5 天后收集上清利用蛋白 A 磁珠（购自金斯瑞）分选法纯化目的蛋白。将磁珠用适当体积的结合缓冲液（PBS+0.1%吐温 20，pH 7.4）重悬（1-4 倍磁珠体积）后加入至待纯化样品中，室温孵育 1 小时，期间温柔振荡。样品置于磁力架上（购自海狸），弃去上清，磁珠用结合缓冲液清洗 3 遍。按照磁珠体积的 3-5 倍体积加入洗脱缓冲液（0.1M sodium citrate, pH 3.2）室温振荡 5-10 min，置回磁力架上，收集洗脱缓冲液，转移至已加入中和缓冲液（1M Tris, pH 8.54）的收集管中混匀。由此分别获得 Urelumab 单抗、4-1BB 单域抗体和 Claudin 18.2 单抗。

实施例 2. 双特异性抗体与 Claudin 18.2 结合

通过慢病毒包被入 Claudin 18.2 cDNA（来自吉凯基因，GCPL0162852），转染 MC38 并产生表达人 Claudin 18.2 的 MC38 细胞，将其命名为 MC38-h Claudin 18.2 细胞。将扩大培养的细胞 MC38-hClaudin 18.2 和 NUGC4（自身表达 hClaudin 18.2）细胞用 0.5 mM EDTA 消化，用培养基清洗一次后调整细胞密度至 2×10^6 细胞/ml，100 μ l/孔加入 96 孔流式板，离心备用。将双特异性抗体用 PBS 稀释，并将上述稀释好的样品 100 μ l/孔加入上述带有细胞的 96 孔流式板中，4 $^{\circ}$ C 孵育 60 min，PBS 清洗两次。100 μ l/孔加入用 PBS 稀释 1000 倍的 Goat anti-human IgG - Fc（PE）（购自 Abcam），4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min，PBS 清洗两次。100 μ l/孔加入 PBS 重悬细胞，在 CytoFlex（Beckman）流式细胞仪上进行检测并计算对应的平均荧光强度（MFI）。

在如上方法的测定实验中，实验结果如图 2A 所示，本发明的双特异性抗体与人肿瘤细胞自身表达的 Claudin 18.2 结合。图 2B 进一步显示，双特异性抗体与鼠肿瘤细胞 MC38 过表达的人的 Claudin 18.2 结合，且与 Claudin 18.2 单抗结合活性相当。

实施例 3. 双特异性抗体抗体与 4-1BB 结合

通过转染克隆到多克隆位点（MCS）的人 4-1BB cDNA 的 PLVX 载体（合成自擎科），产生过表达人 4-1BB 的 CHO 细胞，将其命名为 CHO-h4-1BB 细胞。将扩大培养的 CHO-h4-1BB 细胞调整细胞密度至 2×10^6 细胞/ml，100 μ l/孔加入 96 孔流式板，离心备用。将双特异性抗体用 PBS 稀释，并将上述稀释好的样品 100 μ l/孔加入上述带有细胞的 96 孔流式

板中，4℃孵育 60 min，PBS 清洗两次。100 μl/孔加入用 PBS 稀释 100 倍的 Goat anti-human IgG - Fc (PE) (Abcam, ab98596)，4℃孵育 30 min，PBS 清洗两次。100 μl/孔加入 PBS 重悬细胞，在 CytoFlex (Beckman)流式细胞仪上进行检测并计算对应的 MFI。在如上方法的测定实验中，实验结果如图 3 所示，本发明的双特异性抗体和 CHO-h4-1BB 细胞有结合活性。

实施例 4. 双特异性抗体激活 Jurkat 细胞 NF-κB 信号通路

将靶细胞 NUGC4 按照 2×10^4 个/孔与 1.2×10^5 个/孔的效应细胞与 4-1BB NF-κB Luciferase/Jurkat (将 Jurkat (ATCC, TIB-152™) 细胞共转染表达人 4-1BB 载体 (金唯智合成) 与 luc2P/NF-κB-RE 载体 (Promega, E8491)，即获得该细胞) 混合接种至 96 孔细胞培养白底板中，并将梯度稀释后的双特异性抗体与终浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 anti-CD3 加入后共孵育 16 小时。使用 Bio-glo luciferase assay system (Promega G7940) 试剂盒显色后用酶标仪收集化学发光信号。结果如图 4 所示，只有本发明的双抗激活了 Jurkat 细胞的 NF-κB 信号通路。

实施例 5. 双特异性抗体诱导 PBMC 杀伤肿瘤细胞

将靶细胞 NUGC4 通过 CellTrace™Violet 试剂盒进行细胞染色，并按照每孔 1×10^4 个/孔接种至 96 孔透明底黑边细胞培养板中，培养 4 小时。收集提前一天复苏的 PBMC 并按照每孔 1×10^5 个/孔加入靶细胞孔中。将梯度稀释后的双特异性抗体与终浓度为 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 的 anti-CD3 混合并加入到细胞孔中孵育。48 小时后使用 Cytation 5 收集 DAPI 荧光信号并计算对应的杀伤强度。结果如图 5 所示，只有双抗分子诱导了 PBMC 对于 Claudin 18.2 阳性肿瘤细胞 NUGC4 的杀伤 (图中纵坐标的数值为扣除了背景值的结果)。

实施例 6. 双特异性抗体诱导 PBMC 的细胞因子释放

将靶细胞 NUGC4 细胞按照每孔 1×10^4 个/孔接种至 96 孔透明底黑边细胞培养板中，培养 4 小时。收集提前一天复苏的 PBMC 并按照每孔 1×10^5 个/孔加入靶细胞孔中。将梯度稀释后的双特异性抗体与终浓度为 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 的 anti-CD3 混合并加入到细胞孔中孵育 48 小时后收集上清。上清中的 IFN γ 和 IL-2 水平使用 human IL-2 ELISA kit

(Invitrogen, 88-7025-77) 和 human IFN γ (Invitrogen, 88-7316-77) ELISA kit 检测并按供应商推荐步骤操作。

结果如图 6A 和 6B 所示，只有双抗分子诱导了 IFN γ 和 IL-2 的释放。

实施例 7. 双特异性抗体的肿瘤抑制活性研究

本实验采用人 MC38-hClaudin 18.2 细胞和 h-4-1BB 转基因 C57BL/6 小鼠模型测定双特异性抗体的抗肿瘤作用。体外培养扩增足够的 MC38-hClaudin 18.2 细胞（在 MC38 细胞基础上过表达 hClaudin 18.2），胰酶消化后收集细胞，用 PBS 清洗 3 遍后计数，按 1×10^6 细胞/小鼠的量接种到雌性 8 周龄的 h-4-1BB 转基因 C57BL/6 小鼠（购自上海南方模式生物科技股份有限公司）右侧腹部皮下。每日观察肿瘤细胞在小鼠皮下成瘤情况，使用游标卡尺测量每只动物右侧腹部皮下肿瘤的最大宽轴 W 和最大长轴 L，使用电子天平称量每只小鼠的体重。按肿瘤体积 $T=1/2 \times W \times W \times L$ 计算每只小鼠右侧腹部皮下肿瘤体积。剔除瘤体积过大和过小的鼠，按平均瘤体积将小鼠平均分为 4 组，每组 6 只。按表 6 分组给药方案分组并注射相应剂量的抗体。

每周 2-3 次测量小鼠肿瘤体积与小鼠体重。于接种肿瘤细胞 29 天后最后一次测量小鼠体重与肿瘤体积，对小鼠执行安乐死。结果如图 7 所示，与 PBS 组相比，Claudin 18.2 单抗 IMAB362 基本没有抑制肿瘤生长的效果，anti-Claudin 18.2 单抗和 anti-4-1BB 单抗联合给药亦无抑瘤效果。而同摩尔剂量的 Claudin 18.2x4-1BB biAb 显著抑制了肿瘤的生长，该组 6 只小鼠全部肿瘤消退，与其他 3 组相比具有显著性差异。

表 2. 肿瘤抑制活性实验方案

组别	给药类别	给药剂量	给药频率
Group 1	PBS	—	每两天给药 1 次，共 4 次
Group 2	Claudin 18.2 mAb + 4-1BB sdAb	3.33 mg/kg+ 1.67 mg/kg	每两天给药 1 次，共 4 次
Group 3	IMAB362	3.33 mg/kg	每两天给药 1 次，共 4 次
Group 4	Claudin 18.2x4-1BB biAb	1 mg/kg	每两天给药 1 次，共 4 次

实施例 8. 双特异性抗体的肿瘤抑制活性研究 (Rechallenge)

本实验采用人 MC38-hClaudin 18.2 细胞和 h-4-1BB 转基因 C57BL/6 小鼠模型测定双

特异性抗体的剂量依赖性地抗肿瘤作用。体外培养扩增足够的 MC38-hClaudin 18.2 细胞（在 MC38 细胞基础上过表达 hClaudin 18.2），胰酶消化后收集细胞，用 PBS 清洗 3 遍后计数，按 1×10^6 细胞/小鼠的量接种到雌性 8 周龄的 h-4-1BB 转基因 C57BL/6 小鼠（购自上海南方模式生物科技股份有限公司）右侧腹部皮下。每日观察肿瘤细胞在小鼠皮下成瘤情况，使用游标卡尺测量每只动物右侧腹部皮下肿瘤的最大宽轴 W 和最大长轴 L，使用电子天平称量每只小鼠的体重。按肿瘤体积 $T=1/2 \times W \times W \times L$ 计算每只小鼠右侧腹部皮下肿瘤体积。剔除瘤体积过大和过小的鼠，按平均瘤体积将小鼠平均分为 5 组，每组 6 只。按表 7 分组给药方案分组并注射相应剂量的抗体。

每周 2-3 次测量小鼠肿瘤体积与小鼠体重。于接种肿瘤细胞 29 天后最后一次测量小鼠体重与肿瘤体积，对小鼠执行安乐死。如图 8 所示，与 PBS 组相比，Claudin 18.2x4-1BB biAb 在 0.06mg/kg、0.25mg/kg、1mg/kg、4mg/kg 剂量范围内可剂量依赖性地显著抑制了肿瘤的生长，0.25mg/kg 组有 4 只小鼠肿瘤消退、1mg/kg 组有 5 只小鼠肿瘤消退、4mg/kg 组 6 只小鼠全部肿瘤消退。将肿瘤消退的 15 只再次接种足够的 MC38-hClaudin 18.2 肿瘤细胞，同时在 6 只新采购的人 4-1BB 转基因 C57BL/6 小鼠皮下接种相同数量的 MC38-hClaudin 18.2 细胞作为对照组，对照组 6 只小鼠肿瘤均快速长大，而给予双抗后肿瘤消退的小鼠肿瘤全部无法生长，表明双抗组小鼠形成了免疫记忆，可阻止 Rechallenge 肿瘤的生长。

表 3. 剂量依赖性肿瘤抑制活性实验方案

组别	给药类别	给药剂量	给药频率
Group 1	PBS	—	每两天给药 1 次，共 4 次
Group 2	Claudin 18.2x4-1BB biAb	0.06 mg/kg	每两天给药 1 次，共 4 次
Group 3	Claudin 18.2x4-1BB biAb	0.25 mg/kg	每两天给药 1 次，共 4 次
Group 4	Claudin 18.2x4-1BB biAb	1 mg/kg	每两天给药 1 次，共 4 次
Group 5	Claudin 18.2x4-1BB biAb	4 mg/kg	每两天给药 1 次，共 4 次

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，但本领域技术人员将理解：根据已经公布的所有教导，可以对细节进行各种修改和变动，并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部分为由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 一种双特异性抗体，其包含 Claudin 18.2 结合实体和 4-1 BB 结合实体，其中，所述 Claudin 18.2 结合实体包含两对相同的免疫球蛋白链，其中，每一对免疫球蛋白链具有一条轻链和一条重链，所述重链包含重链可变区和重链恒定区；所述轻链包含轻链可变区和轻链恒定区；所述 4-1 BB 结合实体包含重链可变区；并且，所述 4-1 BB 结合实体的重链可变区与所述 Claudin 18.2 结合实体的重链的 C 末端连接；其中，

所述 Claudin 18.2 结合实体包含：如 SEQ ID NO: 1 所示的重链可变区 (VH) 中含有的 VH CDR1 或其变体、VH CDR2 或其变体以及 VH CDR3 或其变体；和/或，如 SEQ ID NO: 2 所示的轻链可变区 (VL) 中含有的 VL CDR1 或其变体、VL CDR2 或其变体以及 VL CDR3 或其变体；

所述 4-1 BB 结合实体包含：如 SEQ ID NO: 3 或 25 所示的重链可变区 (VH) 中含有的 VH CDR1 或其变体、VH CDR2 或其变体以及 VH CDR3 或其变体；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加，例如保守置换）；优选地，所述的置换是保守置换；

优选地，所述 VH 中含有的 3 个 CDR 和/或所述 VL 中含有的 3 个 CDR 由 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义。

2. 权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其具有选自下列的一项或两项特征：

(1) 所述 Claudin 18.2 结合实体包含：

包含下述 3 个互补决定区 (CDRs) 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 9 的 VH CDR1、序列为 SEQ ID NO: 10 的 VH CDR2、序列为 SEQ ID NO: 11 的 VH CDR3；和/或，包含下述 3 个互补决定区 (CDRs) 的轻链可变区 (VL)：序列为 SEQ ID NO: 12 的 VL CDR1、序列为 SEQ ID NO: 13 的 VL CDR2、序列为 SEQ ID NO: 14 的 VL CDR3；其中，所述 CDR 由 IMGT 编号系统定义；或

(2) 所述 4-1 BB 结合实体包含：

包含下述 3 个互补决定区 (CDRs) 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 15 的 VH CDR1、序列为 SEQ ID NO: 16 的 VH CDR2、序列为 SEQ ID NO: 17 的 VH CDR3；其

中，所述 CDR 由 IMGT 编号系统定义。

3. 一种双特异性抗体，其包含 Claudin 18.2 结合实体和 4-1 BB 结合实体，其中，所述 Claudin 18.2 结合实体包含两对相同的免疫球蛋白链，其中，每一对免疫球蛋白链具有一条轻链和一条重链，所述重链包含重链可变区和重链恒定区；所述轻链包含轻链可变区和轻链恒定区；所述 4-1 BB 结合实体包含重链可变区；并且，所述 4-1 BB 结合实体的重链可变区与所述 Claudin 18.2 结合实体的重链的 C 末端连接；

其中，所述 Claudin 18.2 结合实体的重链可变区 (VH) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR)：

(i) VH CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 9，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(ii) VH CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 10，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，和

(iii) VH CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 11，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；

所述 Claudin 18.2 结合实体的轻链可变区 (VL) 包含下述 3 个互补决定区 (CDR)：

(iv) VL CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 12，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(v) VL CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 13，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，和

(vi) VL CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 14，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；

所述 4-1 BB 结合实体的重链可变区包含下述 3 个互补决定区 (CDR)：

(vii) VH CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 15，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，

(viii) VH CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO: 16，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，和

(ix) VH CDR3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 17, 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;

优选地, 所述 Claudin 18.2 结合实体, 其包含: 如下 3 个重链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 9 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 10 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 11 的 VH CDR3; 和/或, 如下 3 个轻链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 12 的 VL CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 13 的 VL CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 14 的 VL CDR3;

优选地, 所述 4-1 BB 结合实体的重链可变区(VH)包含: 如下 3 个重链 CDRs: 序列为 SEQ ID NO: 15 的 VH CDR1, 序列为 SEQ ID NO: 16 的 VH CDR2, 序列为 SEQ ID NO: 17 的 VH CDR3;

优选地, 所述重链可变区还包含来源于人的框架区序列(例如, 人免疫球蛋白)。

4. 权利要求 3 所述的双特异性抗体, 其中, 所述 Claudin 18.2 结合实体包含:

(a) 重链可变区(VH), 其包含选自下列的氨基酸序列:

(i) SEQ ID NO: 1 所示的序列;

(ii) 与 SEQ ID NO: 1 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列; 或

(iii) 与 SEQ ID NO: 1 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列;

和/或,

(b) 轻链可变区(VL), 其包含选自下列的氨基酸序列:

(iv) SEQ ID NO: 2 所示的序列;

(v) 与 SEQ ID NO: 2 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列; 或

(vi) 与 SEQ ID NO: 2 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列;

优选地, (ii)或(v)中所述的置换是保守置换;

优选地, 所述 Claudin 18.2 结合实体包含: 具有如 SEQ ID NO: 1 所示的序列的 VH

和具有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的 VL。

5. 权利要求 3 或 4 所述的双特异性抗体，其中，所述 4-1 BB 结合实体包含：

(a) 重链可变区 (VH)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO: 3 或 25 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO: 3 或 25 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO: 3 或 25 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列；

优选地，(ii) 中所述的置换是保守置换。

6. 权利要求 1-5 任一项所述的双特异性抗体，其中，所述 Claudin 18.2 结合实体还包含：

(a) 人免疫球蛋白的重链恒定区 (CH) 或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加（例如，至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）；和

(b) 人免疫球蛋白的轻链恒定区 (CL) 或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换（例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的保守置换）；

优选地，所述重链恒定区是 IgG 重链恒定区，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区；优选地，所述轻链恒定区是 κ 或 λ 轻链恒定区；

优选地，所述 Claudin 18.2 结合实体包含 SEQ ID NO: 8 所示的轻链恒定区 (CL)；

优选地，所述双特异性抗体还包含不与 Fc 受体 (FcR) 结合的 Fc 片段；或者，包含具有降低的效应器功能的 Fc 片段，所述效应器功能为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、补体依赖的细胞毒性 (CDC) 或抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)；

优选地，所述 Fc 片段选自下列的任意一项突变：

(a) 具有 L235E 突变的 IgG1Fc 片段；

- (b) 具有 L234A 和/或 L235A 突变的 IgG1Fc 片段；
- (c) 具有 P329G 或 P329A 突变的 IgG1Fc 片段；
- (d) 具有 F234A 和/或 L235A 或 L235E 突变的 IgG4Fc 片段；
- (e) 具有 H268Q、V309L、A330S 和/或 P331S 突变的 IgG2Fc 片段；或
- (f) 具有 V234A、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S 和/或 P331S 突变的 IgG2Fc 片段；

更优选地，所述 Fc 片段为具有 L234A 和 L235A 突变的 IgG1Fc 片段；

优选地，所述 Fc 片段具有 SEQ ID NO: 4 所示的序列。

7. 权利要求 1-6 任一项的双特异性抗体，其中，所述双特异性抗体还包含肽接头，并且，所述 Claudin 18.2 结合实体和 4-1 BB 结合实体通过肽接头连接；

优选地，所述 Claudin 18.2 结合实体的重链恒定区的 C 端与 4-1 BB 结合实体的重链可变区的 N 端通过肽接头连接；

优选地，所述肽接头具有如 SEQ ID NO: 5 或 26 所示的序列；

优选地，所述双特异性抗体的重链具有如 SEQ ID NO: 6, 27, 28 或 29 所示的氨基酸序列；

优选地，所述双特异性抗体的轻链具有如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

8. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1-7 任一项所述的双特异性抗体，或其重链和/或轻链，或 Claudin 18.2 结合实体的重链可变区和/或轻链可变区，或 4-1 BB 结合实体的重链可变区。

9. 载体，其包含权利要求 8 所述的分离的核酸分子；优选地，所述载体为克隆载体或表达载体。

10. 宿主细胞，其包含权利要求 8 所述的分离的核酸分子或权利要求 9 所述的载体。

11. 免疫缀合物，其包含权利要求 1-7 任一项所述的双特异性抗体以及连接于所述双特异性抗体的治疗剂；

优选地，所述治疗剂选自细胞毒剂；

优选地，所述治疗剂选自烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂，及其任意组合；

优选地，所述免疫缀合物是抗体-药物偶联物（ADC）。

12. 药物组合物，其含有权利要求 1-7 任一项所述的双特异性抗体或者权利要求 11 所述的免疫缀合物，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂；

优选地，药物组合物还包含另外的药学活性剂；

优选地，所述另外的药学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物，例如烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂、放射增敏剂、抗血管生成剂、细胞因子、分子靶向药物、免疫检查点抑制剂或溶瘤病毒；

优选地，所述双特异性抗体或免疫缀合物与所述另外的药学活性剂作为分离的组分或作为同一组合物的组分提供。

13. 一种抑制表达 Claudin 18.2 的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞的方法，其包括将所述肿瘤细胞与有效量的权利要求 1-7 任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 11 所述的免疫缀合物，或权利要求 12 所述的药物组合物接触。

14. 权利要求 1-7 任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 11 所述的免疫缀合物在制备药物中的用途，所述药物用于在受试者（例如人）中预防和/治疗肿瘤；

优选地，药物还包含另外的药学活性剂；

优选地，所述另外的药学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物，例如烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂、放射增敏剂、抗血管生成剂、细胞因子、分子靶向药物、免疫检查点抑制剂或溶瘤病毒；

优选地，所述肿瘤表达 Claudin 18.2；

优选地，所述肿瘤涉及表达 Claudin 18.2 的肿瘤细胞；优选地，所述 Claudin 18.2 在所述肿瘤细胞表面上表达；

优选地，所述肿瘤选自胃癌、肝癌、胆道癌、肾细胞癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、卵巢癌、睾丸癌、子宫内膜癌、肺癌、食管癌、胰腺癌、支气管癌、乳腺癌、耳鼻喉(ENT)癌、结肠癌、头颈癌、胆囊癌；

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人。

15. 权利要求 1-7 任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 11 所述的免疫缀合物，或权利要求 12 所述的药物组合物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于：

- (1) 识别或结合表达 Claudin 18.2 的细胞；
- (2) 识别或结合表达 4-1BB 的细胞；
- (3) 激活细胞的 NF- κ B 信号通路；
- (4) 诱导细胞（例如，免疫细胞）激活杀伤肿瘤的活性；
- (5) 诱导细胞（例如，免疫细胞）分泌细胞因子（例如，IFN γ 和 IL-2）；
- (6) (1)-(5) 的任意组合。

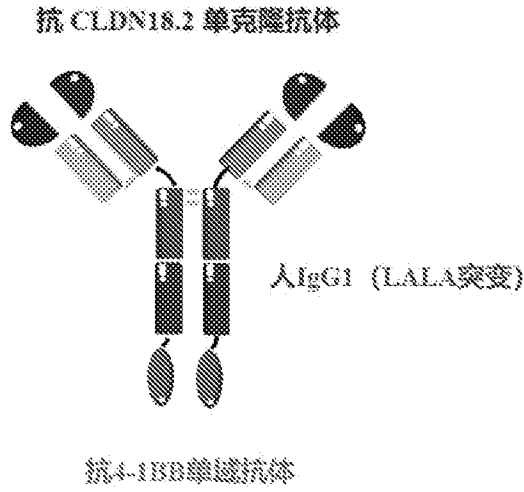


图 1

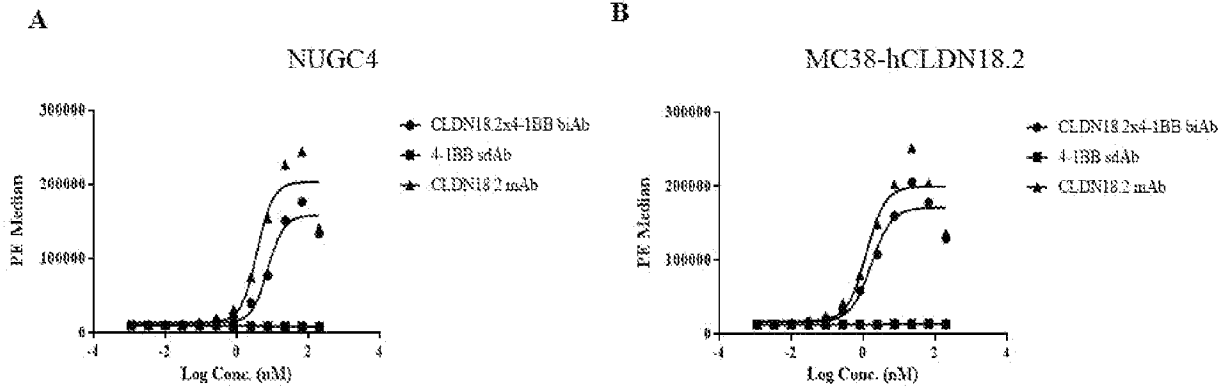


图 2

CHO-h4-1BB

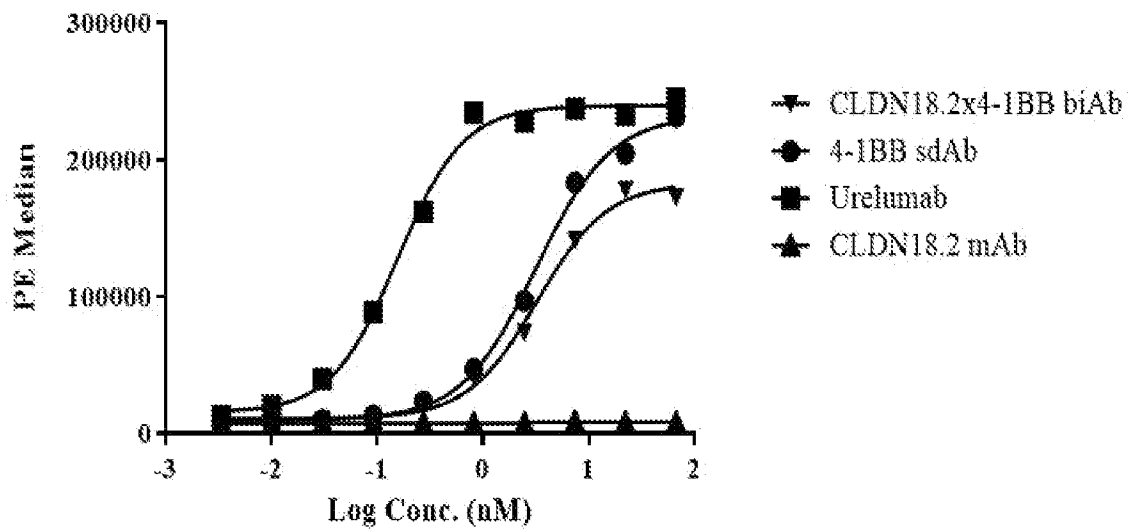


图 3

NUGC4 + Jurkat-4-1BB-NFkB

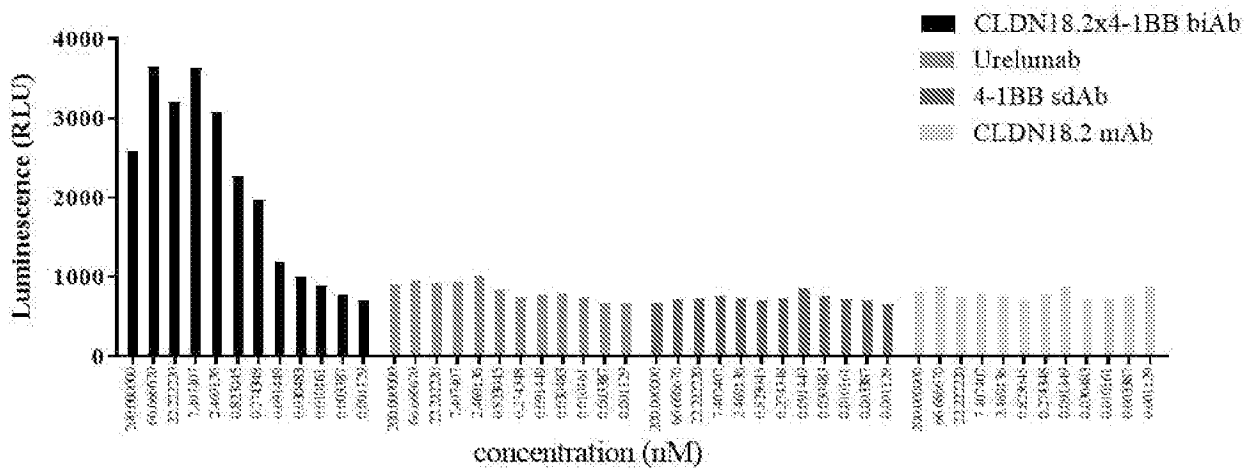


图 4

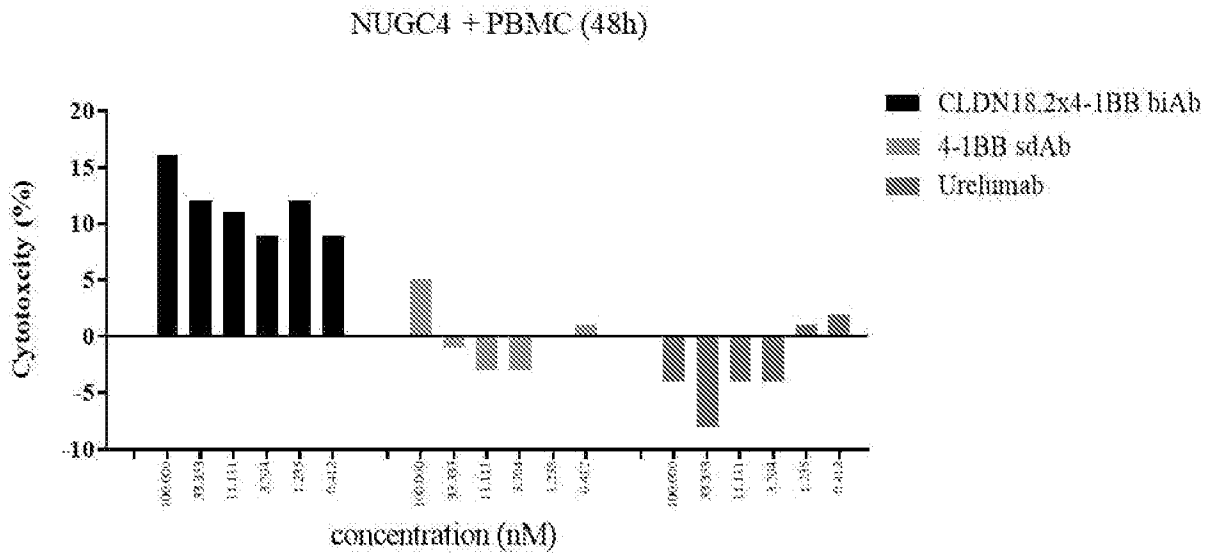


图 5

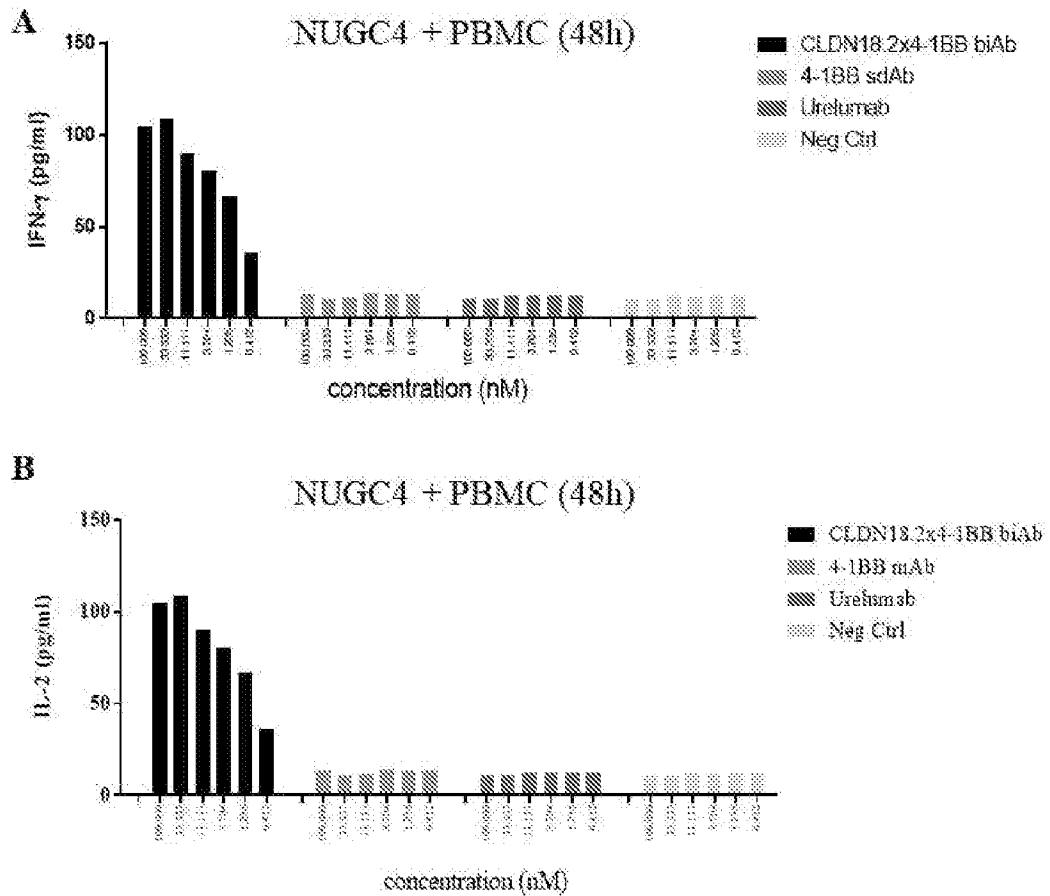


图 6

MC38-hCLDN18.2 in h4-1BB KI C57BL/6 mice

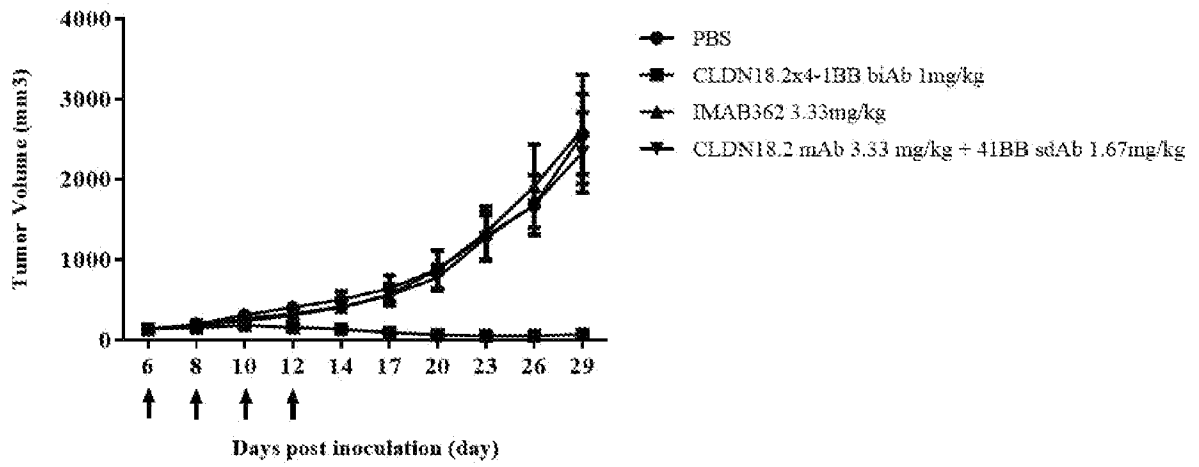


图 7

MC38-hCLDN18.2 in h4-1BB KI C57BL/6 mice (Re-challenge)

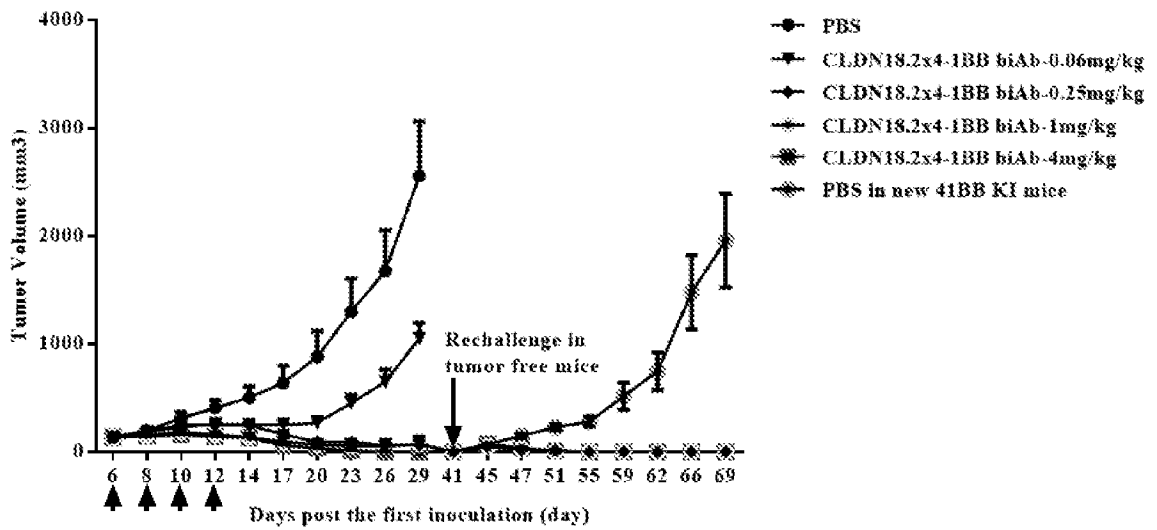


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/113031

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61K; A61P; G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science, GenBank, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System: 双, 多, 特异, 抗体, 纳米, 单, 域, 重链, 密蛋白, 簇, bispecific, multispecific, antibody, Fab, nanobody, single domain, heavy chain, VHH, claudin, CLDN, 18.2, cluster, 137, CD137, 4-1BB, IgG(H)-V, 本申请的SEQ ID NOs: 1-3和25		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 113166265 A (I-MAB BIOPHARMA(SHANGHAI)CO., LTD.; ABL BIO, INC.) 23 July 2021 (2021-07-23) entire document, in particular claims and abstract	1-15
Y	张峰等 (ZHANG, Feng et al.). "双特异性抗体研发进展 (Development in Bispecific Antibody)" <i>药物分析杂志 (Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis)</i> , Vol. 39, No. 1, 31 December 2019 (2019-12-31), entire document, in particular figure 1	1-15
Y	Zhai, T. et al. "Chain B, anti-4-1BB VHH" <i>PDB: 7D4B_B</i> [retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov], 19 July 2021 (2021-07-19), entire document, in particular TITLE and ORIGIN	1-15
Y	CN 112912396 A (SHANGHAI JIBEI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 04 June 2021 (2021-06-04) entire document, in particular embodiment 91, and SEQ ID NOs: 1, 92, and abstract	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 August 2022		Date of mailing of the international search report 26 October 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
 - [1] The sequence listing is actually submitted in the form of a document compliant with ST.26 standard.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/CN2022/113031

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 113166265 A	23 July 2021	PH 12021551269 A1 SG 11202104131V A WO 2021027850 A1 PE 20211147 A1 IL 283379 A CL 2021001375 A1 CA 3117740 A1 US 2021317224 A1 KR 20210082482 A AU 2020329466 A1 CO 2021006953 A2 EP 3853257 A1	03 November 2021 28 May 2021 18 February 2021 28 June 2021 29 July 2021 07 January 2022 18 February 2021 14 October 2021 05 July 2021 27 May 2021 19 August 2021 28 July 2021
CN 112912396 A	04 June 2021	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/113031

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; A61K; A61P; G01N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science, GenBank, 中国专利生物序列检索系统:双,多,特异,抗体,纳米,单,域,重链, 密蛋白,簇, bispecific, multispecific, antibody, Fab, nanobody, single domain, heavy chain, VHH, claudin, CLDN, 18.2, cluster, 137, CD137, 4-1BB, IgG(H)-V, 本申请的SEQ ID NOs:1-3和25</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 113166265 A (天境生物科技上海有限公司 ABL生物有限公司) 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23) 全文, 尤其是权利要求书和摘要</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>张峰, 等. “双特异性抗体研发进展” 药物分析杂志, 第39卷, 第1期, 2019年12月31日 (2019 - 12 - 31), 全文, 尤其是图1</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Zhai, T., 等. “Chain B, anti-4-1BB VHH” PDB: 7D4B_B [获取自https://www.ncbi.nlm.nih.gov], 2021年7月19日 (2021 - 07 - 19), 全文, 尤其是TITLE和ORIGIN</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 112912396 A (上海吉倍生物技术有限公司) 2021年6月4日 (2021 - 06 - 04) 全文, 尤其是权利要求书、SEQ ID NOs: 91、92和摘要</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 113166265 A (天境生物科技上海有限公司 ABL生物有限公司) 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23) 全文, 尤其是权利要求书和摘要	1-15	Y	张峰, 等. “双特异性抗体研发进展” 药物分析杂志, 第39卷, 第1期, 2019年12月31日 (2019 - 12 - 31), 全文, 尤其是图1	1-15	Y	Zhai, T., 等. “Chain B, anti-4-1BB VHH” PDB: 7D4B_B [获取自 https://www.ncbi.nlm.nih.gov], 2021年7月19日 (2021 - 07 - 19), 全文, 尤其是TITLE和ORIGIN	1-15	Y	CN 112912396 A (上海吉倍生物技术有限公司) 2021年6月4日 (2021 - 06 - 04) 全文, 尤其是权利要求书、SEQ ID NOs: 91、92和摘要	1-15
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
Y	CN 113166265 A (天境生物科技上海有限公司 ABL生物有限公司) 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23) 全文, 尤其是权利要求书和摘要	1-15															
Y	张峰, 等. “双特异性抗体研发进展” 药物分析杂志, 第39卷, 第1期, 2019年12月31日 (2019 - 12 - 31), 全文, 尤其是图1	1-15															
Y	Zhai, T., 等. “Chain B, anti-4-1BB VHH” PDB: 7D4B_B [获取自 https://www.ncbi.nlm.nih.gov], 2021年7月19日 (2021 - 07 - 19), 全文, 尤其是TITLE和ORIGIN	1-15															
Y	CN 112912396 A (上海吉倍生物技术有限公司) 2021年6月4日 (2021 - 06 - 04) 全文, 尤其是权利要求书、SEQ ID NOs: 91、92和摘要	1-15															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年8月29日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年10月26日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>吴永庆</p> <p>电话号码 +86-10-62089161</p>															

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:
- [1] 序列列表实际是以符合ST. 26的文件形式提交的。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/113031

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	113166265	A	2021年7月23日	PH	12021551269	A1	2021年11月3日
				SG	11202104131V	A	2021年5月28日
				WO	2021027850	A1	2021年2月18日
				PE	202111147	A1	2021年6月28日
				IL	283379	A	2021年7月29日
				CL	2021001375	A1	2022年1月7日
				CA	3117740	A1	2021年2月18日
				US	2021317224	A1	2021年10月14日
				KR	20210082482	A	2021年7月5日
				AU	2020329466	A1	2021年5月27日
				CO	2021006953	A2	2021年8月19日
				EP	3853257	A1	2021年7月28日
<hr/>							
CN	112912396	A	2021年6月4日	无			
<hr/>							